Einfluß endogener Änderungen der Plasmakonzentrationen von Insulin und Glucagon auf ihre spezifische Bindung und auf die Adenylatcyclase der Leberzelle

Christoph Knothe

1981

Aus der Forschergruppe Diabetes und der III. med. Abteilung
des Krankenhauses München-Schwabing
(Chefarzt: Prof. Dr. med. H. Mehnert)

EINFLUSS ENDOGENER ÄNDERUNGEN DER PLASMAKONZENTRATIONEN VON INSULIN UND GLUCAGON AUF IHRE SPEZIFISCHE BINDUNG UND AUF DIE ADENYLATCYCLASE DER LEBERZELLE.

Untersuchungen an stoffwechselgesunden und diabetischen Ratten nach Teilhepatektomie.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Christoph Knothe
aus
München
1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. W. Bachmann
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. Mehnert
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 12. 1981

Inhaltsverzeichnis Seite

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

1	Einleitung	6
2	Materialien und Methoden	10
2.1	Chemikalien, Geräte, Tiere	10
2.1.1	Chemikalien	10
2.1.2	Radiochemikalien	11
2.1.3	Geräte	11
2.1.4	Tiere	12
2.2	Erzeugen des Diabetes	13
2.2.1	Herstellung von Streptozotocin	13
2.2.2	Injektion des Streptozotocin	13
2.3	Teilhepatektomie	13
2.4	Töten der Tiere	15
2.5	Bestimmung der Plasmaspiegel von Enzymen und Hormonen	16
2.6	Präparation der Plasmamembran (Bachmann et al.)	16
2.7	Bestimmung von Protein und Plasmamembranenzymen	20
2.8	Bestimmung der Hormonbindung an die Plasmamembran	20
2.9	Adenylatcyclasetest nach Salomon	21
2.9.1	Herstellen der radioaktiven Lösungen	21
2.9.2	Herstellen des radioaktiven Standards	22
2.9.3	Testansatz und Inkubation	22
2.9.4	Trennung des ^{32}P-3'5' cAMP vom ^{32}P-ATP	23
2.9.4.1	Präparation von Dowex	25
2.9.4.2	Präparation der Dowex- und Aluminium-Säulen	25
2.9.4.3	Eluation	26

		Seite
2.10	Aderylatcyclasetest nach White modifiziert von Kiss	26
2.10.1	Vorbereitung der Säulen	26
2.10.2	Herstellen des Testansatzes	27
2.11	Auswertung	27
2.11.1	Zählung	27
2.11.2	Berechnung	28
2.11.3	Begründung für die Verwendung der Methode nach White	29
3	Ergebnisse	
3.1	Stoffwechselgesunde Ratten	30
3.1.1	Klinische Charakterisierung	30
3.1.2	Blutuntersuchungen	32
3.1.2.1	Leberspezifische Serumenzyme	32
3.1.2.2	Blutglucose, Insulin und Glucagon im Plasma	36
3.1.3	Untersuchungen an Leberplasmamembranen	38
3.1.3.1	Membranprotein und -markerenzyme der Membranpräparation (Tab.IV)	38
3.1.3.2	Bindung von Insulin und Glucagon an die Plasmamembran	40
3.1.3.3	Aktivität der Adenylatcyclase in der Plasmamembran (Abb.5)	40
3.1.3.3.1	Basale Aktivität	40
3.1.3.3.2	Stimulation mit Glucagon	43
3.1.3.3.3	Stimulation mit Glucagon bei Zusatz von GTP	43
3.1.3.3.4	Stimulation mit NaF	43
3.1.3.3.5	Stimulation mit Prostacyclin	44
3.1.3.3.6	Vergleich der Aktivitäten der Adenylatcyclase in der Plasmamembran und im Homogenat	44

		Seite
3.2	Diabetische Tiere	45
3.2.1	Klinische Charakterisierung (Tab.V)	45
3.2.2	Blutuntersuchungen	47
3.2.2.1	Leberspezifische Serumenzyme	47
3.2.2.2	Blutglucose, Insulin und Glucagon im Plasma	47
3.2.3	Untersuchungen an Leberplasmamembranen	51
3.2.3.1	Membranprotein und -markerenzyme der Membranpräparation (Tab.VI)	51
3.2.3.2	Bindung von Insulin und Glucagon an die Plasmamembran	53
3.2.3.3	Aktivität der Adenylatcyclase in der Plasmamembran (Abb. 10)	55
3.2.3.3.1	Basale Aktivität	55
3.2.3.3.2	Stimulation mit Glucagon	55
3.2.3.3.3	Stimulation mit Glucagon bei Zusatz von GTP	55
3.2.3.3.4	Stimulation mit NaF	57
3.3	Vergleich der Ergebnisse bei stoffwechselgesunden diabetischen Tieren nach Teilhepatektomie	57
3.3.1	Klinische Charakterisierung	57
3.3.2	Blutuntersuchungen	58
3.3.2.1	Leberspezifische Serumenzyme	58
3.3.2.2	Blutglucose, Insulin und Glucagon im Plasma	58
3.3.3	Untersuchungen an Leberplasmamembranen	59
3.3.3.1	Membranprotein und -markerenzyme der Membranpräparation	59
3.3.3.2	Bindung von Insulin und Glucagon an die Plasmamembran	59
3.3.3.3	Aktivität der Adenylatcyclase in der Plasmamembran	60
4	Diskussion	61
5	Zusammenfassung	79
6	Literatur	82

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen Seite

Abb. 1: Enzymaktivitäten der GOT und GPT im Plasma stoffwechselgesunder Ratten nach 2/3-Teilhepatektomie 34

Abb. 2: Enzymaktivitäten der LDH und Alkalischen Phosphatase im Plasma stoffwechselgesunder Ratten nach 2/3-Teilhepatektomie 35

Abb. 3: Blutzucker, Insulin (IRI) und Glucagon (IRG) im Plasma stoffwechselgesunder Ratten nach 2/3-Teilhepatektomie 37

Abb. 4: Glucagon- und Insulinbindungskapazität an die Leberplasmamembran stoffwechselgesunder Ratten nach 2/3-Teilhepatektomie 41

Abb. 5: Enzymaktivität der Adenylatcyclase in Plasmamembranfraktionen der Leber nach 2/3-Teilhepatektomie bei stoffwechselgesunden Ratten 42

Abb. 6: Enzymaktivitäten der GOT und GPT im Plasma diabetischer Ratten nach 2/3-Teilhepatektomie 48

Abb. 7: Enzymaktivitäten der LDH und Alkalischen Phosphatase im Plasma diabetischer Ratten nach 2/3-Teilhepatektomie 49

Abb. 8: Blutzucker, Insulin (IRI) und Glucagon (IRG) im Plasma diabetischer Ratten nach 2/3-Teilhepatektomie 50

Abb. 9: Glucagon- und Insulinbindungskapazität an die Leberplasmamembran diabetischer Ratten nach 2/3-Teilhepatektomie 54

Abb. 10: Enzymaktivität der Adenylatcyclase in Plasmamembranfraktionen der Leber nach 2/3-Teilhepatektomie bei diabetischen Ratten 56

Seite

Tab. I: Schematische Darstellung der Isolierung von Plasmamembranen aus Lebergewebe 18

Tab. II: Reihenfolge der Pipettierung der für den Adenylatcyclasetest notwendigen Reagenzien 24

Tab. III: Körper- und Lebergewicht bei stoffwechselgesunden Ratten in Beziehung zur 2/3-Teilhepatektomie 33

Tab. IV: Vergleich von Protein und Markerenzymen für Plasmamembranen, Endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien in Homogenaten und Plasmamembranfraktionen der Leber nach 2/3-Teilhepatektomie bei stoffwechselgesunden Ratten 39

Tab. V: Körper- und Lebergewicht bei diabetischen Ratten in Beziehung zur 2/3-Teilhepatektomie 46

Tab. VI: Vergleich von Protein und Markerenzymen für Plasmamembranen, Endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien in Homogenaten und Plasmamembranfraktionen der Leber nach 2/3-Teilhepatektomie bei diabetischen Ratten 52

Tab. VII: Vergleich der Enzymaktivitäten der Adenylatcyclase zwischen der Methode nach Salomon und der Methode nach White 31

1 EINLEITUNG

Das Wissen um die große Regenerationsfähigkeit der Leber reicht bis in die Antike zurück. In der Prometheussage von Aischylos (1) etwa nagt ein Geier täglich an dem immer wieder nachwachsenden Organ des Gottesfrevlers. Die Kenntnis von dieser Regenerationsfähigkeit hat in der modernen Medizin die therapeutischen Möglichkeiten in ansonsten fatalen Erkrankungssituationen erheblich erweitert. In der inneren Medizin gelingt es durch extrakorporale Unterstützung, auch schwerste akute toxische oder entzündliche Leberparenchymschäden zu überbrücken, in der Leberchirurgie ist eine großzügige Resektion möglich geworden.

Im Tierexperiment kommt es nach einer Teilhepatektomie von bis zu zwei Dritteln der Leber zu einer vollständigen Restauration der Gewebemasse. Gut dokumentiert ist dies bei Ratten, die schon im vergangenen Jahrhundert als Versuchstiere dienten (vgl. Bresnick 10) und bei denen bereits 1931 durch Higgins und Anderson (27) die noch heute anerkannte Standardmethode der 2/3-Resektion entwickelt wurde. Noch nicht geklärt sind die Mechanismen, die den Regenerationsprozeß in Gang setzen, steuern und beenden. Hormonuntersuchungen im Tierexperiment, aber auch beim Menschen weisen darauf hin, daß diese Vorgänge - zumindest teilweise - einer endokrinen Kontrolle unterliegen, wobei den Pankreashormonen Insulin und Glucagon möglicherweise eine wesentliche Rolle zukommt (Leffert 43). So erfolgt bei der teilhepatektomierten Ratte nach Pankreatektomie und Eviszeration ein Wachstum der Restleber nur unter

Infusion dieser beiden Hormone (Bucher 11). Bei erwachsenen Ratten führt die Infusion von Insulin und Glucagon zu einer geringen DNS-Synthese sogar in der ruhenden Leberzelle (Bucher, zitiert nach Leffert 43). Andererseits hemmen Insulinantikörper die Leberzell-DNS-Synthese (Bucher, zitiert nach Leffert 43). Nicht zuletzt gelten die spezifischen Hormonänderungen, die nach Teilhepatektomie im Gegensatz zu scheinoperierten Tieren auftreten, als Beweis für das Mitwirken der Hormone (Leffert 43). Im einzelnen findet sich in allen Arbeitsgruppen ein starker Anstieg der Glucagonkonzentration im Plasma (5,11,42,43,52,71). Die Ergebnisse für den Verlauf der Insulinkonzentration sind nicht so übereinstimmend. Morley (52) findet keine Veränderungen nach Teilhepatektomie, während Bucher (11), Leffert (43) und Bachmann (5) einen raschen Abfall feststellen.

Kontaktstelle der Hormone Glucagon und Insulin an der Leber sind spezifische Rezeptoren an der Außenseite der Oberflächenmembran der Sinusoide (= Leberplasmamembran). Die Zahl der spezifischen Hormonrezeptoren wird weitgehend von der Plasmakonzentration der entsprechenden Hormone bestimmt. Wie durch zahlreiche Studien belegt ist, besteht zwischen Plasmakonzentration und Hormonrezeptorzahl eine inverse Korrelation,d.h. bei erhöhten Plasmakonzentrationen wird die Rezeptorenzahl vermindert und umgekehrt (Mourelle 53, Leffert 43, Literaturübersicht bei Bachmann 5). Dies gilt offenbar auch für die endogen bedingten Veränderungen der Konzentrationen von Insulin und Glucagon. Darüber hinaus lassen sich an der Leberplasmamembran eine Vielzahl von Änderungen hinsichtlich des Protein- (Tauber 77, Bresnick 10) und des Lipidge-

haltes (Koizumi 39, Bachmann 7) nachweisen, die möglicherweise modifizierend die intrazelluläre Hormonwirkung beeinflussen (Houslay 30).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich weniger mit den Regelmechanismen und der Bedeutung der Hormonänderungen für die Regeneration der Leber, vielmehr sollen die Wechselwirkungen zwischen Hormon und Rezeptor sowie deren Auswirkungen auf ein "Erfolgsorgan", das membrangebundene Enzym Adenylatcyclase, untersucht werden.

Das Enzym Adenylatcyclase katalysiert die Synthese des "second messenger" (Sutherland 84) cAMP aus ATP und ist somit daran beteiligt, eine Information, die durch Hormonbindung zu einer Zelle gelangt, in Veränderungen im Stoffwechsel der Zelle umzusetzen. Für die Leberzelle gilt, daß sowohl Insulin als auch Glucagon die Aktivität der Adenylatcyclase beeinflussen können (Rodbell und Mitarbeiter, 63,64,66; Hepp 26).

Wie alle durch Hormone stimulierbaren Enzymsysteme umfaßt die Adenylatcyclase folgende Komponenten (zitiert nach Helmreich 25): Ein Rezeptor empfängt spezielle chemische oder physikalische Signale, überträgt sie auf einen Transmitter, der die Botschaft moduliert und kontrolliert und über einen Verstärker auf den Receiver weiterleitet. Neuere Vorstellungen über die Wirkungskette Hormon-Rezeptor-Katalytische Einheit der Adenylatcyclase (Houslay 31; Helmreich 25; Literatur bei Schlegel 69) gehen davon aus, daß katalytische Einheit

und Rezeptor getrennt in der inneren bzw. äußeren Plasmamembranschicht "schwimmen". Durch GTP aktivierbare Nucleotid-Regulator-Proteine beteiligen sich an der Regulation der beiden Komponenten. Regulatorproteine, die funktionell, wahrscheinlich aber nicht strukturell von den oben erwähnten verschieden sind, übernehmen nach der Hormonbindung die Kopplung beider Einheiten.

Wie bereits erwähnt, war die wesentliche Aufgabe dieser Studie, die Wechselwirkungen zwischen Plasmakonzentrationen von Insulin und Glucagon mit ihren spezifischen Rezeptoren an der Leberzelle sowie deren intrazellulären Auswirkungen auf die Adenylatcyclase unter dem Einfluß endogener Hormonänderungen zu untersuchen. Im Experiment wurden diese endogenen Hormonänderungen durch eine Teilhepatektomie bei stoffwechselgesunden Ratten hervorgerufen, die zu einer Hyperglucagonämie und einer relativen Hypoinsulinämie führt (5,11,43). Eine Teilhepatektomie bei diabetischen Ratten, wie sie in einer zweiten Versuchsreihe durchgeführt wurde, bot darüber hinaus die Möglichkeit, die Plasmahormonänderungen nach Teilhepatektomie mit denen einer vorwegbestehenden diabetischen Stoffwechsellage zu verbinden. Hierbei ließ sich zusätzlich der absolute Insulinmangel mit in die Untersuchung einbeziehen. Da mit dem absoluten Insulinmangel bei Diabetes auch eine Hyperglucagonämie verbunden ist, war in der zweiten Versuchsreihe gegenüber der ersten eine Verstärkung der Hyperglucagonämie zu erwarten.

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Chemikalien, Geräte, Tiere

2.1.1 Chemikalien

Albumin	(Humanalbumin)	Behringwerke AG,Marburg
Al_2O_3	(Aluminiumoxid)	
AMP	(Adenosin-5'monophosphat)	Boehringer,Mannheim
ADP	(Adenosin-5'diphosphat)	Boehringer,Mannheim
ATP	(Adenosin-5'triphosphat)	Boehringer,Mannheim
cAMP	(Adenosin-3':5'-monophosphat cyclisch)	Boehringer,Mannheim
$CaCl_2$	(Calciumchlorid)	E.Merck,Darmstadt
CK	(Kreatinkinase)	Serva,Heidelberg
CP	(Kreatinphosphat)	Serva,Heidelberg
Dowex	(Wx 4, Mesh 200-400, Gegenion H^+)	
EDTA	(Äthylendiamintetraessigsäure Titriplex III)	E.Merck,Darmstadt
Eisessig	(Essigsäure 100 %)	E.Merck,Darmstadt
Glucagon		Serva,Heidelberg
GTP	(Guanosin-5'-triphosphat)	Boehringer,Mannheim
Imidazol		E.Merck,Darmstadt
$MgCl_2$	(Magnesiumchlorid)	E.Merck,Darmstadt
NaF	(Natriumfluorid)	E.Merck,Darmstadt
$NaHCO_3$	(Natriumhydrogencarbonat)	E.Merck,Darmstadt
Nembutal^R		Deutsche Abbott GmbH Ingelheim
Prostacyclin	(Gabe von Dr.Janka)	
SDS	(Dodecylsulphat-Na-Salz)	Serva,Heidelberg
Streptozotocin		Upjohn Comp,Kalamazoo Mich. USA

Szintigel für wässrige Medien	Roth KG,Karlsruhe
Trasylol^{R}	Bayer AG, Leverkusen
Tris-HCI (Trishydroxymethylaminomethan)	E.Merck,Darmstadt

2.1.2 Radiochemikalien

^{32}P-ATP	(Adenosin-5'-(a-^{32}P)-triphospat triethylenammonium salt P.B.107)	Amersham,England
^{3}H-cAMP	((8-^{3}H)-Adenosin-3':5'-cyclicphosphat, ammonium salt TRK.304)	Amersham,England
^{125}J-Insulin		Novo Research,Copenhagen
^{125}J-Glucagon		Novo Research,Copenhagen

2.1.3 Geräte

Zentrifuge	Sorvall- "superspeed" RC 2-B
Ultrazentrifuge	Beckmann-Instruments Model L 5 - 65 oder L 2 - 65o
Tischzentrifuge	Beckmann 152 - Mikrofuge
pH - Meter	L. Pusl, München
Rüttler	Eppendorf Gerätebau
Thermostat	Eppendorf Gerätebau
Siebpresse	

Potter	
Refraktometer	
Dewar	
Ständer für die Glasröhrchen mit der Möglichkeit, Reagenzgläser oder Zählgefäße darunterzustellen	
Glasröhrchen	Neumann München
Szintillationszähler Mark II	Nuclear Chicago
Eppendorfpipetten (5,10,20,50,100,200,500,1000 µl)	Eppendorf Gerätebau
Pipetten verstellbar (1-200, 1-1000, 1-5000 µl)	Gilson Frankreich
Eppendorfcups 1,5 ml	Eppendorf Gerätebau
Fäden	
Klemmen	Äskulap

2.1.4 Tiere

Als Versuchstiere dienten für diese Arbeit ausschließlich männliche Wistarratten (Fa. Kisslegg, Allgäu), um etwaige Einflüsse des Hormonzyklus der weiblichen Tiere auszuschließen. Zur Zeit der Teilhepatektomie bzw. der Streptozotocininjektion wogen die Ratten 120-180 g und waren ca. 50 Tage alt. Vor ihrer Verwendung konnten sie sich mindestens 4 Tage an die Laborumgebung mit einem konstanten Tag/Nacht-Rhythmus (Helligkeit von 7-19 Uhr) gewöhnen. Zwölf Stunden vor jeder Plasmamembranpräparation wurde ihnen das gängige Trockenfutter Altromin (Altromin GMBH Lage-Lippe) entzogen, nicht jedoch das Wasser. Während 4 bis 5 gesunde Tiere in einem Käfig lebten, waren die diabetischen zu maximal dreien in einem Käfig untergebracht, da sie wegen ihrer erhöhten Ausscheidung und ihres Durstes einer besonderen Pflege bedurften.

2.2 Erzeugen des Diabetes

2.2.1 Herstellung von Streptozotocin

Die Streptozotocinlösung wurde unmittelbar vor der Verwendung hergestellt. Dazu wurde Streptozotocin in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung, die mit einem Tropfen Eisessig auf pH 4 eingestellt worden war, gelöst.

2.2.2 Injektion des Streptozotocins

Die Tiere erhielten eine einmalige Streptozotocininjektion von 80 mg/kg Körpergewicht in die durch heißes Wasser hyperämisierte Schwanzvene. Die Letalitätsrate während der 7 Tage nach Streptozotocininjektion, bedingt durch extreme diabetische Stoffwechselentgleisung, lag unter 2 %. Um einen möglichen lebertoxischen Schaden durch Streptozotocin in engen Grenzen zu halten, wurden die Tiere erst eine Woche nach dem Erzeugen des Diabetes teilhepatektomiert bzw. die diabetischen Kontrolltiere getötet. Durch die regelmäßige Messung von mehreren leberspezifischen Enzymaktivitäten im Plasma sollte eine mögliche Leberschädigung durch Streptozotocin bei jedem Tier individuell erfaßt werden.

2.3 Teilhepatektomie

Die Teilhepatektomie erfolgte nach der Methode von Higgins und Anderson (27). Jedes Tier erhielt kurz

vor der Operation eine leichte Äthernarkose. Nach Durchtrennen von Fell, Bauchdecke und Peritoneum ließ sich durch gleichmäßigen seitlichen Druck der zentrale und linke Leberlappen, d.h. etwa zwei Drittel der Lebermasse, exprimieren. Die zu entfernenden Leberlappen wurden dann mit Cat abgebunden und anschließend durch einen Schnitt knapp distal der Knoten, der möglichst wenig Gewebe am abgebundenen Gefäßstamm zurückließ, entfernt. Nach sorgfältigem Zurücklegen der mitherausgedrückten Gedärme wurde der Bauchraum zugeklammert. Komplikationen bei dieser Methode ergaben sich aus der unterschiedlichen Empfindlichkeit der Tiere gegenüber dem Äther sowie fehlerhaftem Abbinden und Abschneiden der Leberlappen. Die unmittelbare Operationssterblichkeit lag mit etwa 2 % erheblich unter der von Higgins und Anderson angegebenen. Da für eine Präparation von Leberplasmamembranen die optimale Lebermasse bei etwa 20g lag, wurden je nach postoperativem Überlebenszeitraum und damit dem Ausmaß der Leberregeneration zwischen 3 und 8 Ratten für eine Präparation teilhepatektomiert.

Diabetische Tiere wurden grundsätzlich eine Woche nach Erzeugen des Diabetes teilhepatektomiert. Die Operationsmortalität und der postoperative Verlauf entsprachen trotz der schweren Vorkrankheit dem der stoffwechselgesunden Ratten.

Bei der Scheinoperation entsprach der Schnitt durch die Leibeshüllen, das Herausdrücken der Leberlappen sowie die Zeitdauer des Vorgangs etwa denen der üblichen Teilhepatektomie.

2.4 Töten der Tiere

Als Narkotikum vor dem Töten diente das Pentabarbital Nembutal^{R} (vgl. Pilkis 58). Die übliche Dosis, verabreicht als i.p.-Injektion, betrug 50 mg/kg Körpergewicht; sie mußte bei Tieren kurz nach der Teilhepatektomie bis zu 70 mg/kg erhöht werden. Die Narkosewirkung trat bei sachgemäßer Applikation sehr rasch ein. Zur Entnahme von Blut und Leber wurde knapp oberhalb des knöchernen Beckenrings, wie bereits bei der Teilhepatektomie beschrieben, der erste Schnitt durch die Bauchdecke angelegt. Davon ausgehend ermöglichten es zwei seitliche Schnitte jeweils bis unter die Zwerchfellenden, die Körperhüllen nach oben wegzuklappen sowie die Gedärme zur Seite zu schieben. Nach dem Durchtrennen der überdeckenden Faszien sowie dem Wegschieben des perivasalen Fettgewebes ließ sich die Aorta mit einer Nadel Nr.1 punktieren. Eine 5 ml-Spritze mit 0,3 ml Trasylol^{R}-EDTA-Gemisch diente zur Entnahme von etwa 3 ml Blut. Anschließend wurde durch die noch in der Aorta steckende Nadel 3 ml einer eiskalten Spüllösung (0,9-prozentige NaCl-Lösung mit 0,5 mM $CaCl_2$) langsam eingespritzt, sodann die Vena cava unterhalb der Nadelspitze eröffnet und die Leber mit ca. 20 ml der Spüllösung durchgespült, bis die perfundierte Flüssigkeit blutfrei war. Während dieses Zeitraums sollten Herz und Lunge, die nach der Blutentnahme meistens ihre Tätigkeit kurz eingestellt hatten, wieder regelmäßig arbeiten. Anschließend wurde die Leber sorgfältig herauspräpariert und, nachdem das anhaftende Blut mit Spüllösung abgewaschen war, in einem eisgekühlten Becherglas für die Plasmamembranpräparation bereitgestellt.

Das entnommene Blut kam, in Eis gekühlt, möglichst rasch zum Abzentrifugieren. Im Plasma wurden Glucose, GOT, GPT, Alkalische Phosphatase, LDH sofort bestimmt und das Plasma für die radioimmunologische Messung von Insulin und Glucagon bis zur Verarbeitung bei -30° C tiefgefroren.

2.5 Bestimmung der Plasmaspiegel von Enzymen und Hormonen

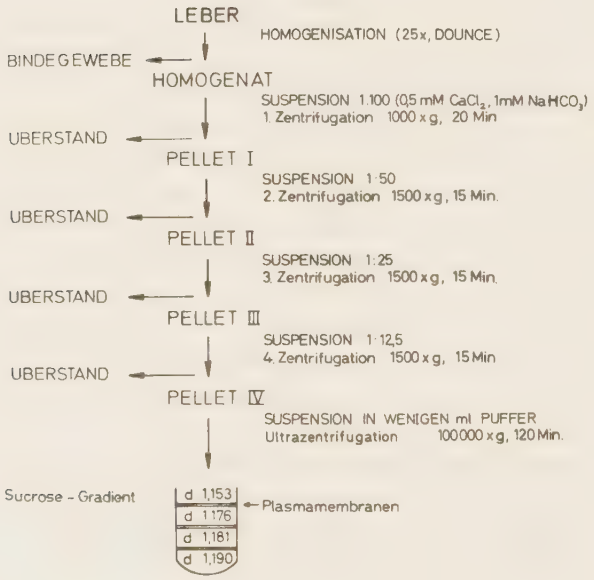
Die Bestimmung von GOT, GPT, LDH und Alkalischer Phosphatase geschah nach der "Optimierten Standard-Methode" der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie (55) mit monotest^{R} - Reagenzien der Boehringer Mannheim GmBH, die der Glucose nach der Hexokinase-Methode (Schmidt F.H. 70)mit der "Test Combination Glucose" von Boehringer Mannheim. Glucagon wurde als immunoreaktives Glucagon (IRG) (Unger et al. 78) gemessen, wobei als Testreagenz ein Antiserum diente, das mit Antikörpern gegen Glucagon (30 K) angereichert war (Lavine et al. 41). Im Prinzip genauso wurde der Insulinplasmaspiegel als immunoreaktives Insulin (IRI) festgestellt (Hales und Randle 23).

2.6 Präparation der Plasmamembran (Bachmann et al. 6)

Die Membranpräparation erfolgte nach einer Modifikation der Methoden von Neville (54) und Ray (60). Sie begann mit der Aufbereitung des Homogenats. Dazu war als erstes das Abtrennen des groben Bindegewebes von den gereinigten

und gewogenen Lebern in einer Siebpresse (Durchmesser der Löcher 0,8 mm) erforderlich. Nach jeder Leber mußte das Sieb gereinigt werden. Der resultierende Leberbrei kam in einen Dounce-Homogenisator von ca. 100 ml Inhalt, in dem das Lebergewebegewicht im Verhältnis 1 : 10 (w/v) mit Puffer (1 mM $NaHCO_3$ - Lösung mit 0,5 mM $CaCl_2$) verdünnt und mit 25 vorsichtigen und gleichmäßigen Pestilzügen (loose pestle) homogenisiert wurde. In einer anschließenden Endverdünnung von 1 : 100 stand das Homogenat unter gelegentlichem Umrühren 10 Minuten lang in der Kältekammer (osmotischer Schock). Die anschließende Filtration durch 4 Lagen Verbandsgaze führte zur Aussonderung von noch vorhandenen Verunreinigungen (z.B. Blutgefäße, Bindegewebe). Zur Bestimmung der Alkalischen Phosphatase, Succinatdehydrogenase, LDH, Glucose-6-Phosphatase und 5'-Nucleotidase im Homogenat wurde ein Aliquot von ca. 2 ml entnommen. Es folgten 4 Zentrifugationen in einer Sorvallzentrifuge bei 100 000 RPM 2o Minuten lang. Als Einsätze dienten Metallbecher von 250 ml Inhalt. (Zentrifugationsschema siehe Tabelle I). Nach den ersten drei Zentrifugationen wurde jeweils der Überstand langsam und gründlich abgekippt und der Pellet in einem kleinen Volumen Puffer aufgenommen, im Potter mit 5 Zügen rehomogenisiert sowie jeweils auf das halbe Puffervolumen der vorangegangenen Zentrifugation verdünnt. Nach der vierten Zentrifugation wurden die Zentrifugenbecher mit möglichst wenig Puffer ausgespült, die Suspension mit 10 Pestilzügen homogenisiert und mit einer Pipette abgemessen. Mit einer 70%igen Saccharoselösung wurde dieses letzte Homogenat auf eine 48%ige Saccharosekonzentration gebracht. Diese Lösung kam, möglichst mit einem Volumen von 10 ml, in drei Beckmann-Zentrifugen-

Tabelle I Schematische Darstellung der Isolierung von Plasmamembranen aus Lebergewebe.



Die Dichte der Sucroseschichten ist mit "d" angegeben (d=1,153 entspricht 37 %, 1,176 41 %, 1,181 45 % und 1,19o 48 % Sucrose). Die in der Zwischenschicht d 1,153/1,176 angereicherten Membranen wurden in den weiteren Untersuchungen eingesetzt.

gläser und wurde von jeweils 10 ml dreier Saccharoselösungen abnehmender Konzentration bis zu einem Endvolumen von 40 ml überschichtet. Die Konzentrationen der Saccharoselösungen wurden routinemäßig vor jeder Präparation in einem Refraktometer überprüft und exakt eingestellt. Die Dichten der einzelnen Schichten betrugen (von unten nach oben) : 1.281 (= 48 % Saccharoselösung), 1.181 (= 45 %), 1.176 (= 41 %), 1.153 (= 37 %).Die Zentrifugation (120 min bei 27 000 Rpm entsprechend 100 000 x g und 4°C) erfolgte in einer Beckmannultrazentrifuge. Im Anschluß daran ließ sich die Membranfraktion, die sich als weißes Häutchen (gesunde Tiere) oder Flocken (diabetische Tiere) in der obersten Saccharosegrenzschicht angesammelt hatte, mit der Pipette absaugen. Durch drei anschließende Zentrifugationen (siehe Zentrifugationsschema) wurden die Membranen mit destilliertem Wasser von der Saccharose freigewaschen. Dazu wurden die gleichen Fraktionen aus verschiedenen Ultrazentrifugen-Bechern jeweils in einem Plastikbecher für Rotor SS 34 (Sorvall) vereint, mit destilliertem, gekühltem Wasser aufgefüllt und durchgeschüttelt. Nach jeder der zwei ersten Zentrifugationen wurde der Überstand abgekippt, der Pellet in etwas destilliertem Wasser aufgenommen, durchgeschüttelt und in einem Glaspotter homogenisiert. Nach der dritten Zentrifugation folgte die Aufnahme des letzten Membranpellets in ein kleines Volumen Aqua destillata. Als Aufbewahrungsort für die in abgemessenen Portionen in Eppendorfcups aufbewahrten Membranen diente ein mit flüssiger Luft (- 30° C) gefüllter Dewar. Lediglich die für den Adenylatcyclasetest vorgesehene Membranmenge wurde bis zu ihrer unmittelbaren Verwendung im Anschluß an die Plasmamem-

branpräparation in Eis aufbewahrt. Routinemäßig fand an jedem Präparationstag eine Doppelpräparation statt.

2.7 Bestimmung von Protein und Plasmamembranenzymen

Der Proteinbestimmung lag die Methode von Lowry et al. (49) mit Rinderserumalbumin als Standard zugrunde. Die Reinheit der verwendeten Plasmamembranen wurde überprüft durch die Bestimmung der Glucose-6-Phosphatase (E.C.3.1.3.9.)(Duve et al.17), die hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum enthalten ist, und der Succinat - 2 - (p - jodophenyl) - 3 - p - nitrophenyl - 5 - phenyltetrazoliumreductase (Succinat - INT - reductase E.C.1.3.9.1., Pennington 57), die vorwiegend in Mitochondrien vorkommt. Die Messung der 5' - Nucleotidase (E.C.3.1.3.5.,Mitchell und Hawthorne 51) sowie der Alkalischen Phosphatase (E.C.3.1.3.1., Emmelot und Bos 18), diente der Charakterisierung der Anreicherung von Plasmamembranen.

2.8 Bestimmung der Hormonbindung an die Plasmamembran

Die Hormonbindung von Insulin und Glucagon erfolgte nach der von Kemmler (35) beschriebenen Methode. Bei der Insulinbindung wurden 80 pg oder 4 ng des ^{125}J-Insulins in einem TRIS-Albumin-Puffer (20 mM TRIS, 2,5 g % Albumin, pH 7,4) mit nicht markiertem Insulin in einer Konzentra-

tion bis zu 40 µg/ml und ca. 100 µg Membranprotein pro Ansatz inkubiert. Bei der Glucagonbindung befand sich zusätzlich 1 mM EDTA im Inkubationsmedium, die Menge des radioaktiv markierten ^{125}J-Glucagons betrug 100 pg, die Konzentration an unmarkiertem Glucagon bis zu 20 µg/ml. Die Radioaktivität der eingesetzten Hormone lag bei 20 ooo - 30 ooo cpm (counts per minute). Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe der Leberplasmamembranen. Nach Beendigung der zweistündigen, unter ständigem leichten Schütteln durchgeführten Inkubation kamen jeweils 400 µl des Testansatzes in ein Zentrifugenröhrchen. Eine Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge trennte mittels einer Silikonschicht freies, nicht gebundenes markiertes Hormon im Überstand von dem an die Membran gebundenem, das sich im Pellet befand. Nach Einfrieren der Röhrchen in flüssiger Luft ließen sie sich leicht in der Höhe der Silikon-Öl-Schicht zerschneiden. Beide Teile wurden getrennt in ein Zählgefäß gegeben und in einem Szintillationszähler gezählt.

2.9. Adenylatcyclasetest nach Salomon (62)

2.9.1 Herstellen der Radioaktiven Lösungen

Die Firma Amersham, England, lieferte das radioaktive Adenosin 5'-(α-^{32}P) Triphosphat, Triäthylammoniumsalz in einem Äthanol/Wassergemisch (V : V = 1 : 1). Die radioaktive Konzentration dieser Stoffe betrug 1 µCi/ml,

die Halbwertszeit des β^-- Strahlers mit einer maximalen Energie von 1.709 MeV belief sich auf 14,3 Tage, d.h. die von uns bestellte Menge von 250 µl entsprechend 250 µCi reichte 2 - 4 Wochen (oder für 16 - 20 Tests). Als erster Schritt wurden 2 x 100 µl sowie 1 x 50 µl aus dem Lieferbehälter in Eppendorfgefäße von 1,5 ml Inhalt pipettiert, die aus Gründen des Strahlungsschutzes in einem Bleiquader steckten. Ein feiner Luftstrom hinter Bleiabschirmung unter dem Abzug trocknete dieses Volumen. Das zurückbleibende, unsichtbare ^{32}P - ATP wurde in 1 ml ATP - Lösung (4.5 mM, pH 7.4) aufgenommen und in 500 µl Portionen im Gefrierschrank aufbewahrt. Die Zugabe von weiterer ATP - Lösung vor jedem Versuch diente dazu, eine cpm - Zahl je 10 µl ^{32}P - Standard von ca. 300 000 - 600 000 zu erreichen. Die Konzentration des radioaktiven ATPs gegenüber dem nicht markierten blieb unter diesen Bedingungen unter 22 %. Das radioaktive ^{3}H - cAMP (Amersham, England) kam in einer Verdünnung von 1 : 500 (w/w) gegenüber dem Lieferzustand zum Einsatz.

2.9.2 Herstellen der radioaktiven Standards

Für den ^{32}P - ATP Standard wurden 10 µl, für den ^{3}H - cAMP Standard 20 µl der jeweiligen für den Test eingesetzten Lösung in ein Packardzählgefäß pipettiert, in dem sich 3 ml Wasser und 10 ml Szintigel befanden.

2.9.3 Testansatz und Inkubation

Bei der Bestimmung der Aktivität der Adenylatcyclase interessierte die Leeraktivität des Testgemisches ohne

Plasmamembranen als Kontrolle, die Basalaktivität (ohne Stimulation) sowie die Stimulation mit Glucagon (Konzentration 0.005 mg/ml) und NaF (10 mM), in späteren Versuchen auch mit Glucagon in Anwesenheit von GTP (10^{-4}M). Zusätzlich wurde achtmal auch eine Stimulation mit Prostacyclin in verschiedenen Konzentrationen (von 10^{-7} - 10^{-2} g/l) versucht. Jede Bestimmung erfolgte grundsätzlich mit Dreifachwerten. Die einzelnen Reagenzien kamen nach gründlichem Aufschütteln entsprechend der Reihenfolge in Tabelle II in ein Eppendorfcup bis zu einem Gesamtvolumen von 100 µl. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 10 µl Membransuspension entsprechend 10 - 70 µg Membranprotein. Beginnend mit einem Basalwert wurde die erste Membranfraktion in das erste Cup pipettiert und dieses anschließend in einen Rüttler gesteckt. Nach 10 sec wurde für das zweite Cup ebenso verfahren, dieses in den Rüttler gesteckt sowie das erste zur Inkubation (37° C für 10 min) in den Thermostat gegeben. Diese Reihenfolge wiederholte sich in 10 - Sekunden- - Abständen bis zum letzten Cup. Die Zugabe von 100 µl der sogenannten Stopplösung (Salomon 71) erhöhte die Molarität des cAMP und beendete die Reaktion nach jeweils 10 Minuten. Im Anschluß an einen letzten Schüttelvorgang (10 sec) wurde das Enzymeiweiß durch Erhitzen denaturiert (3 Minuten in einem 95° C - Heizer). Nach Zugabe von 0,4 ml Wasser und 20 µl ^{3}H - cAMP wurden die Proben im Eisbad abgekühlt.

2.9.4 Trennung des ^{32}P - 3'5'cAMP von ^{32}P - ATP

Die Trennung des nach jeder Präparation noch im Übermaß vorhandenen ^{32}P - ATP vom Reaktionsprodukt ^{32}P - cAMP, das

T a b e l l e II

Pipettierschema für den Adenylatcyclasetest

	Kontrolle K (µl)	Basalwert B (µl)	Glucagon G (µl)	Gluc.+GTP G+GTP (µl)	NaF (µl)
Tris/HCL	1o	1o	1o	1o	1o
$MgCl_2$	1o	1o	1o	1o	1o
Albumin	1o	1o	1o	1o	1o
Glucogon	-	-	1o	1o	-
GTP	-	-	-	1o	-
NaF	-	-	-	-	1o
H_2O (ver.Tris)	3o	2o	1o	-	1o
EDTA	1o	1o	1o	1o	1o
cAMP	1o	1o	1o	1o	1o
CP/CK	1o	1o	1o	1o	1o
^{32}P-ATP	1o	1o	1o	1o	1o
Membranen	-	1o	1o	1o	1o

Endkonzentration der Stoffe im Ansatz:

Tris/HCL	2o	mM	EDTA	1	mM
$MgCl_2$	5	mM	cAMP	1	mM
Albumin	o,1	%	CP	1o	mM
Glucagon	o,o5	µg/ml	CK	o,3	mg/ml
GTP	o,1	mM	^{32}p-ATP	o,45	mM
NaF	1o	mM			

(Die Stoffe waren alle auf einen pH von 7,4 eingestellt)

allein zu messen war, erfolgte über Dowex- und Aluminiumsäulen.

2.9.4.1 Präparation von Dowex

Dowex (Wx 4, Mesh 200 - 400, Gegenion H^3) wurde in einem Becherglas mit 1 N HCL 10 min gerührt (W/V = 1:1). Nach Sedimentation wurde der Überstand verworfen, das Becherglas mit Wasser aufgefüllt sowie wieder für 10 min gerührt. Rühren und Abkippen wiederholte sich solange, bis im Überstand ein pH von 3 - 4 herrschte. Um in den Säulen hinterher bei 1 ml Suspensionszugabe eine Dowexhöhe von 3 cm zu erreichen, bewährte sich ein Verhältnis Dowex : Wasser von 10 : 8. Dieses Dowexgemisch ließ sich längere Zeit verwenden, jedoch mußte vor jedem Test der pH kontrolliert und eventuell neu eingestellt werden.

2.9.4.2 Präparation der Dowex- und Aluminium-Säulen

Ein fest eingepreßtes Schaumstoffplättchen dichtete unten jede Säule ab. Vor jedem Versuch wurde in die Dowexsäulen 1 ml des Dowexgemisches sowie sofort anschließend 1 ml Wasser pipettiert. War beides durchgelaufen, konnte der Testansatz darüber gegeben werden. Ein Trockenlaufen der Säulen war zu vermeiden. In die Aluminiumsäulen wurde jeweils 0,6g Al_2O_3 eingewogen. Diese Säulen waren für etwa 10 Versuche benutzbar, ohne daß der Kontrollwert anstieg; sie mußten jedoch vor jedem Versuch mit 8 ml Imidazolpuffer (0,1 M, pH 7,4) äquilibriert werden.

2.9.4.3 Eluation

Der Testansatz in den einzelnen Cups wurde nach 10 sec Aufschütteln auf die Dowexsäulen gegeben. Nach dem Durchlaufen eluierte 0,4 ml Wasser nach, anschließend ein weiterer Milliliter Wasser. War auch dessen Spiegel verschwunden, wurden die Auffanggefäße so rasch wie möglich gewechselt. Die alten, in denen sich der Großteil des ^{32}P - ATPs befand, kamen zum radioaktiven Abfall. In den Dowexsäulen spülten abschließend 3 ml Wasser nach. Das daraus resultierende Eluat wurde, versetzt mit 200 µl Imidazolpuffer (1,5 M, pH 8,3), auf die Aluminiumsäulen gegeben. Das neuerliche Eluat wurde bereits in Packardzählgefäßen (20 ml Fassungsvermögen) aufgefangen. Den Abschluß bildete eine nochmalige Eluation mit 1 ml Imidazolpuffer (0,1 M, pH 7,4). Für die Zählung im Szintillationszähler kam in die Packard-Gefäße noch 10 ml Szintigel.

2.10 Adenylatcyclasetest nach White (80) (modifiziert von Kiss 38)

2.10.1 Vorbereitung der Säulen

Wie üblich dichtete ein Schaumstoffplättchen die Säulen, in die diesmal 1 g Al_2O_3 eingewogen waren, nach unten ab. Diese Säulen standen nur immer für je einen Test zur Verfügung, da bei öfterem Gebrauch trotz Äquilibrierung mit Imidazolpuffer der Leerwert stark und stetig anstieg.

2.10.2 Herstellen des Testansatzes

Das Zusammenpipettieren entsprach derjenigen der Salomon-Methode (2.9). Auch der Reaktionsstart durch Zugabe der Membranen und das Schütteln waren identisch. Nach dem Schütteln wurde jedoch ein Aliquot von 60 µl entnommen und zur Inkubation (wiederum 10 min bei 37° C) in ein bereits im Heizer steckendes Eppendorf-cup eingebracht. Dadurch betrug der Abstand zwischen zwei Cups sowie die Schüttelzeit aus technischen Gründen 20 sec. Nach 10 min beendete das Zupipettieren von 200 µl 0,5 M HCl-Lösung, d.h. das Denaturieren im 20 sec-Rhythmus die Reaktion. Das Schütteln der Cups, das Erhitzen auf 95° C (hier für 6 min) und zuletzt das Abkühlen im Eisbad entsprach wieder der Methode nach Salomon. Nach dem Zupipettieren von 200 µl Imidazol-puffer (pH 8,3, 1,5M) sowie 20 µl ^{3}H - cAMP wurde mit einer 500 µl Pipette das Gemisch auf die Aluminiumsäulen übertragen und anschließend mit 3 ml Imidazolpuffer (0,01 M, pH 7,4) nachgespült. Wie vorher war das Eluat in Packardzählgefäßen aufzufangen und mit 10 ml Szintigel zu mischen.

2.11 Auswertung

2.11.1 Zählung

Die cpm des radioaktiv markierten cAMP wurden in einem Szintillationszähler gezählt. Als optimale Einstellung

(Allgayer 2) der Zählfenster für die beiden Isotope zur Berechnung der Wiederfindung für das doppelt markierte cAMP erwies sich:

Kanal A (^{3}H - Kanal)	lower level :	01
	upper level :	25
	range :	B 900
Kanal B (^{32}P - Kanal)	lower level :	05
	upper level :	50
	range :	G 455

Im Ausdruck des Gerätes erschien die Zählzeit von 10 min, die cpm des ^{3}H - sowie des ^{32}P - Kananls sowie als sog. Quench ein Zahlenverhältnis für den beim Zählvorgang auftretenden Löscheffekt, dem Unterschied zwischen dpm (decay per minute) und cpm.

2.11.2 Berechnung

Mit Hilfe eines Magnetkarten-Rechenprogramms konnte auf einer Olivetti-Rechenmaschine (Programma 101) die Aktivität der Adenylatcyclase in nmol 3'5'cAMP/g Membranprotein / min berechnet werden. Hierzu war zunächst durch Eingabe des ^{32}P-Quenches, des ^{32}P-Standards sowie der durch 0,22 (Konstante) dividierten cpm des ^{3}H-Standards (^{3}H-Kanal) eine Zahl Z zu ermitteln. In einem neuen Schritt wurde diese, ein aus ^{32}P- sowie ^{3}H-Kanal des ^{32}P-Standards gebildetes Kanalverhältnis und die cpm des ^{32}P-Standards eingegeben. Nun ließen sich die Proben einzeln berechnen, wozu in folgender Reihenfolge eingetippt werden mußten: Quench, cpm ^{3}H-Kanal, cpm ^{32}P-Kanal

der Kontrollwerte, Proteinmenge im Ansatz sowie Inkubationszeit.

Für die Auswertung wurden die Ergebnisse für die Basalrate, die Stimulation mit Glucagon, mit Glucagon in Anwesenheit von GTP sowie mit NaF pro Überlebenszeit nach Teilhepatektomie zusammengefaßt und jeweils Mittelwert und die Standardabweichung der Mittelwerte (SEM) bestimmt. Hinzu kam die Bildung eines Verhältnisses von jeder Stimulation zum Basalwert sowie von der Stimulation mit Glucagon in Anwesenheit von GTP zur Stimulation mit Glucagon allein.

2.11.3 Begründung für die Verwendung der Methode nach White

Für die Bestimmung der Adenylatcyclaseaktivität in der Leberplasmamembran bei diabetischen Ratten wurde die Methode nach White (modifiziert von Kiss) gewählt. Sie unterscheidet sich von der Methode nach Salomon, die bei den stoffwechselgesunden Tieren zur Anwendung kam, durch eine andere Abtrennung des gebildeten cAMP's von der Ausgangssubstanz ATP bei prinzipiell gleichem Testansatz (vgl. Methodenbeschreibung). Die Methode nach White bedurfte dabei keiner so sorgfältigen und zeitraubenden Überwachung der Chromatographie. Durch den unkomplizierteren Arbeitsgang war auch die Anzahl der gleichzeitig durchführbaren Testreihen nicht so stark limitiert wie bei der Methode nach Salomon. Bei Vorversuchen mit gleichzeitiger Anwendung beider Methoden bei Ratten 12 bzw. 24 Stunden nach Teilhepatektomie konnte der in der Literatur angegebene höhere Leerwert bei der Methode nach White nicht bestätigt werden. (Leerwert bei dieser Studie

33 ± 2 cpm bei der Methode nach Salomon, 32 ± 2 bei der nach White, d.h. jeweils 0,008 % der eingesetzten Radioaktivität - Tabelle VII -). Die in Übereinstimmung mit der Literatur festgestellte höhere Wiederfindung von cAMP (gemessen an Hand der Wiederfindung von ^{3}H - cAMP, bei der Methode nach Salomon etwa 30 %, bei der nach White etwa 66 %) konnte durch ein von Hepp übernommenes Rechenprogramm, in das verschiedene Testeinflüsse, u.a. die unterschiedlichen cAMP - Wiederfindungen eingenen, ausgeglichen werden.

Da sich bei den Vorversuchen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Methoden erkennen ließen, wurde wegen der leichteren Handhabung im zweiten Abschnitt dieser Studie (diabetische Tiere) die Methode nach White angewandt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Stoffwechselgesunde Ratten

3.1.1 Klinische Charakterisierung

Das Entfernen von zwei Dritteln der Leber nach der Methode von Higgins und Anderson (27) führte in den ersten 48 Stunden zu einer leichten Reduktion des Körpergewichts auf annähernd 85 % des Ausgangsgewichtes (Tabelle III). Im Anschluß daran kam es zu einer kontinuierlichen Gewichtszunahme. Das Ausgangsgewicht

Tabelle VII Vergleich der Enzymaktivitäten der Adenylatcyclase zwischen den Methoden nach White und nach Salomon

Die Enzymaktivität ist in nmol (^{32}P) 3'5'AMP/g min angegeben.
B = Basalaktivität, G = Stimulation mit Glucagon (5ug/ml), G + GTP = Stimulation mit Glucagon (5ug/ml) in Anwesenheit von GTP (10mM), NaF = Stimulation mit NaF (10mM)
Die Angaben erfolgen als Mittelwert ± SEM der in den Klammern angegebenen Fallzahlen.
Die Signifikanz wurde nach Student's t-Test für unverbundene Stichproben errechnet. (n.s.= nicht signifikant)

12 h nach Teilhepatektomie	B	G	G + GTP	NaF
Methode nach White	28 ± 6 (4)	92 ± 5 (6)	225 ± 31 (6)	481 ± 91 (5)
Methode nach Salomon	21 ± 4 (6)	55 ± 7 (8)	240 ± 19 (6)	625 ± 70 (7)
Signifikanz	n.s.	p = 0,005	N.s.	n.s.

24 h nach Teilhepatektomie	B	G	G + GTP	NaF
Methode nach White	11 ± 2 (7)	21 ± 2 (6)	67 ± 13 (5)	194 ± 31 (5)
Methode nach Salomon	16 ± 4 (10)	32 ± 5 (11)	110 ± 15 (9)	310 ± 38 (11)
Signifikanz	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Vergleich der Leerwerte bei den beiden Methoden

Die Leerwerte sind in cpm (= counts per minute) angegeben. Die Angaben erfolgen als Mittelwert ± SEM der in den Klammern angegebenen Fallzahlen.
Die Signifikanz wurde nach Student's t-Test für unverbundene Stichproben errechnet.(n.s.= nicht signifikant)

Methode nach White	32 ± 2 (54)
Methode nach Salomon	33 ± 2 (55)
Signifikanz	n.s.

wurde zwischen dem 5. und 10. Tag wieder erreicht. Auf Grund des nur geringen Gewichtsabfalls schien die Teilhepatektomie somit keine allzu große Belastung für die Tiere darzustellen, zumal zu dieser Gewichtsreduktion auch das nächtliche Fasten vor dem Präparationstag beitrug. Aus Aussehen und Verhalten ließ sich ebenfalls keine größere Beeinträchtigung im körperlichen Wohlbefinden der Ratten ableiten.

Das Gewicht der bei der Teilhepatektomie entnommenen beiden großen Leberlappen schwankte relativ gering um einen Mittelwert von 4,9 Gramm bei den durchschnittlich 160 g schweren Ratten (Tabelle III). Eine Zunahme des Lebergewichts war bereits nach 24 Stunden zu beobachten; das Ausgangsgewicht wurde jedoch erst zwischen der dritten und vierten Woche erreicht.

3.1.2 Blutuntersuchungen

3.1.2.1 Leberspezifische Serumenzyme

Die Enzymaktivitäten von GOT und GPT im Plasma (Abbildung 1) waren 12 Stunden nach der Teilhepatektomie auf das 15 bis 20fache des Ausgangswertes erhöht. Einem zunächst raschen Abfall bis zur 72. Stunde auf etwa das 1,5 bis 2fache der Kontrollaktivität folgte ein stark verzögertes,weiteres Absinken. Nach 21 Tagen war der Ausgangswert wieder erreicht (nicht abgebildet).

Das Enzym LDH zeigte einen ähnlichen Kurvenverlauf (Abbildung 2). 12 Stunden nach Teilhepatektomie war die Enzymaktivität um den Faktor 10 höher als bei den Kon-

Tabelle III Körper- und Lebergewicht bei stoffwechselgesunden Ratten in Beziehung zur Teilhepatektomie (TH)

Die Angaben erfolgen als Mittelwert ± SEM

		Körpergewicht (g) vor OP	Körpergewicht (g) nach OP	Lebergewicht (g) bei TH (entnommener Teil)	Lebergewicht (g) bei Präp.
Kontrolltiere ohne TH	(n = 71)	148 ± 2	-	-	5,0 ± 0,1
Zeitabstand nach TH					
12 Std.	(n = 23)	157 ± 4	145 ± 4	4,5 ± 0,2	2,2 ± 0,1
18 Std.	(n = 15)	168 ± 9	152 ± 7	5,3 ± 0,3	2,1 ± 0,1
24 Std.	(n = 29)	176 ± 3	154 ± 2	5,4 ± 0,2	2,5 ± 0,1
48 Std.	(n = 27)	167 ± 3	144 ± 3	5,1 ± 0,2	3,3 ± 0,1
72 Std.	(n = 4)	129 ± 2	117 ± 4	4,0 ± 0,4	3,2 ± 0,1
5 Tage	(n = 17)	163 ± 3	152 ± 3	5,0 ± 0,1	3,7 ± 0,1
10 Tage	(n = 14)	135 ± 3	174 ± 4	4,2 ± 0,2	5,8 ± 0,4

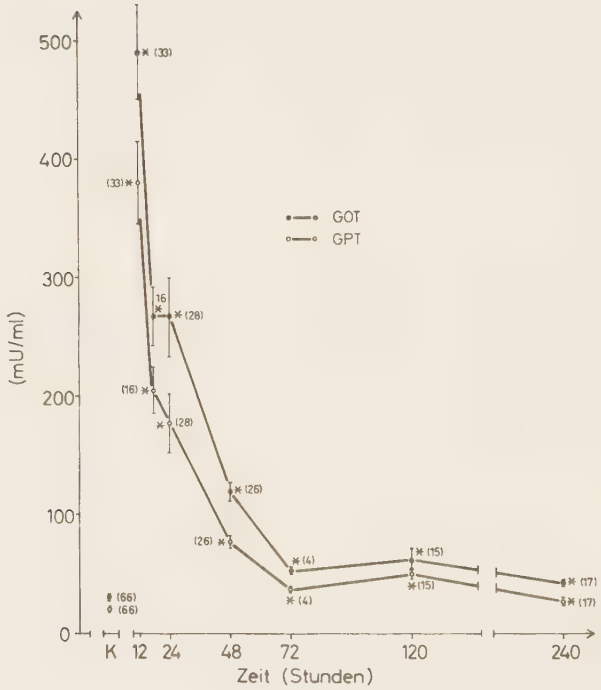


Abbildung 1: Enzymaktivitäten der GOT und GPT im Plasma stoffwechselgesunder Ratten nach 2/3-Teilhepatektomie.

Die Angaben erfolgen als Mittelwerte ± SEM der in Klammern angegebenen Fallzahlen. Die Enzymeinheiten sind als mU/ml angegeben, die Berechnung der Signifikanz erfolgte nach Student's t-Test für unverbundene Stichproben.

* = signifikant gegenüber dem Kontrollwert auf dem $p < 0.001$ - Niveau.

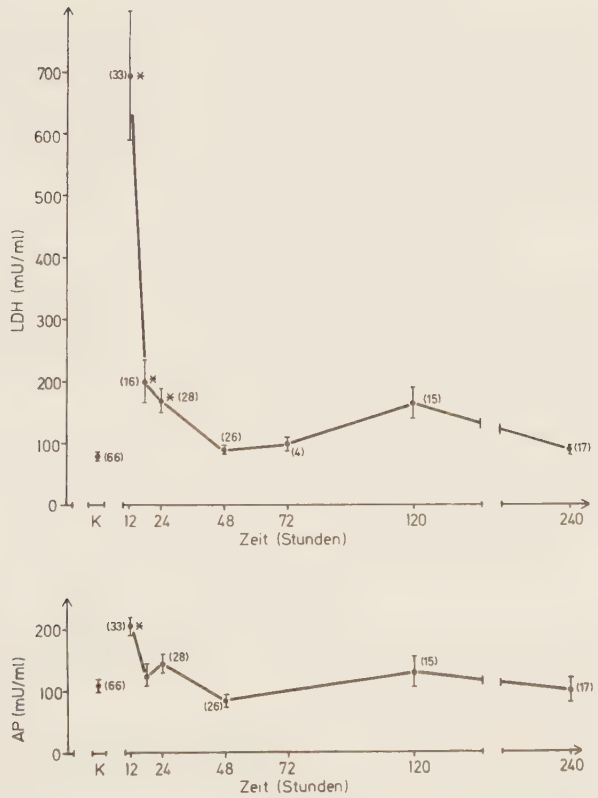


Abbildung 2: Enzymaktivitäten der LDH und AP im Plasma stoffwechselgesunder Ratten nach 2/3-Teilhepatektomie.

Die Angaben erfolgen als Mittelwerte ± SEM der in Klammern angegebenen Fallzahlen. Die Enzymeinheiten sind als mU/ml angegeben, die Berechnung der Signifikanz erfolgte nach Student's t-Test für unverbundene Stichproben.

* = signifikant gegenüber dem Kontrollwert auf dem $p < 0.001$ - Niveau.

trollen. Eine Normalisierung der Enzymaktivität im Plasma wurde aber bereits 48 Stunden nach der Operation wieder erreicht. Im Gegensatz zu den intrazellulären Enzymen war die Aktivität der plasmamembrangebundenen Alkalischen Phosphatase nur geringfügig nach 12 Stunden erhöht und nach 18 Stunden bereits im Normalbereich.

Insgesamt boten diese Enzymänderungen ein Bild, das für eine Leberzellnekrose typisch ist. Diese Nekrose betraf offensichtlich das von der Blutzufuhr abgeschnittene Lebergewebe, das beim Entfernen der Lappen aus technischen Gründen in der Bauchhöhle verbleiben mußte.

3.1.2.2 Blutglucose, Insulin und Glucagon im Plasma

Der Verlauf von Blutzucker, Insulin und Glucagon ist in Abbildung 3 dargestellt.

Die Glucose zeigte während des gesamten Untersuchungszeitraums bis 30 Tage nach Teilhepatektomie keine signifikanten Schwankungen.

Der Plasmaglucagonspiegel stieg bis auf das 10fache des Ausgangswertes 18 Stunden nach Teilhepatektomie an. Nach einem relativ raschen Abfall bis zur 48. Stunde nach Teilhepatektomie auf das Doppelte des Ausgangsniveaus blieb die Plasmakonzentration des Glucagons für den weiteren Beobachtungszeitraum (bis zum 30. Tag nach Teilhepatektomie) auf diesem erhöhten Niveau.

Im Gegensatz zum Anstieg des Glucagons fiel die Plasmakonzentration des Insulins bis zur 24. Stunde nach Teil-

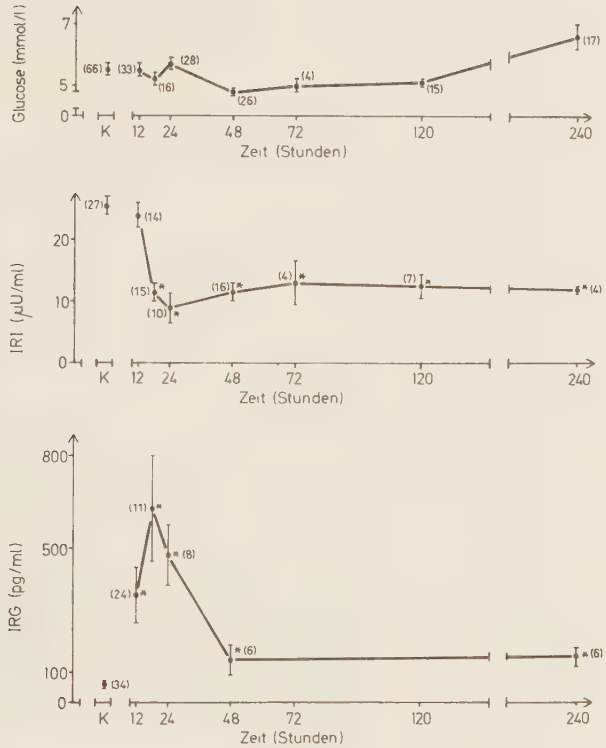


Abbildung 3: Blutzucker, Insulin (IRI) und Glucagon (IRG) im Plasma stoffwechselgesunder Ratten nach 2/3-Teilhepatektomie.

Die Angaben erfolgen als Mittelwerte ± SEM der in Klammern angegebenen Fallzahlen. Die Glucose ist in mmol/ml aufgeführt, Insulin in µU/ml und Glucagon in pg/ml. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte nach Student's t-Test für unverbundene Stichproben.

* = signifikant auf dem $p < 0{,}001$ - Niveau gegenüber dem Kontrollwert.

hepatektomie auf etwa 50 % des Ausgangsspiegels ab. Auch die Insulinspiegel kehrten während des Beobachtungszeitraums nicht auf das Niveau der Kontrollen zurück, sondern blieben signifikant erniedrigt.

3.1.3 Untersuchungen an Leberplasmamembranen

3.1.3.1 Membranprotein und -markerenzyme der Membranpräparation (Tabelle IV)

Die Bestimmung von Proteinertrag und Enzymänderungen diente der Feststellung der Reinheit der Membranen sowie der Vergleichbarkeit der einzelnen Membranpräparationen untereinander.

Der Ertrag an Plasmamembranprotein pro Gramm Leberfrischgewicht schwankte zwischen 0,40 und 0,85 mg.

Aus den absoluten und relativen Aktivitäten der Enzyme Glucose-6-Phosphatase und Succinatdehydrogenase, die den Grad der Verunreinigung mit Endoplasmatischen Retikulum bzw. Mitochondrien anzeigen, ließ sich eine sehr niedrige und vergleichbare Verunreinigung mit diesen Zellorganellen ableiten.

Bei der Alkalischen Phosphatase, die plasmamembrangebunden ist, fand sich sowohl im Homogenat als auch in der Membranfraktion im Zeitraum zwischen 12 Stunden und 24 Stunden nach Teilhepatektomie ein starker absoluter Aktivitätsanstieg. Die relative spezifische Aktivität,die das Verhältnis der Enzymaktivität in der Plasmamembran zu der im Homogenat angibt, blieb dabei konstant. Ab der

Tabelle IV: Vergleich von Protein und von Markerenzymen für Plasmamembranen, Endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien in Homogenaten und Plasmamembranfraktionen der Leber nach 2/3-Teilhepatektomie bei stoffwechselgesunden Ratten

Hom=Homogenat, PM=Plasmamembranfraktion, RSA=relative spezifische Aktivität
Die Angaben für Hom und PM erfolgen als Mittelwert±SEM
RSA gibt den Anreicherungsfaktor zwischen PM und Hom wieder
*p≤0,01 nach Student's t-Test für unverbundene Stichproben

	Protein[1]		5'-Nucleotidase[2]			Alkalische Phosphatase[3]			Glucose-6-Phosphatase[4]			Succinatdehydrogenase[5]	
	Hom	PM	Hom	PM	RSA	Hom	PM	RSA	Hom	PM	RSA	Hom	PM
Kontrolle ohne TH (n=19)	1,93±0,02	0,46±0,04	5,37±0,16	69,5±2,85	12,9	19± 1	227±14	12,0	4,20±0,21	1,28±0,07	0,30	1,80±0,05	0,09±0,02
12 Std. nach TH (n= 5)	1,94±0,03	0,43±0,08	5,62±0,04	57,3±0,82	10,2	78±13*	962±70*	12,3	3,74±0,19	1,00±0,24	0,27	1,33±0,06*	0,18±0,03
18 Std. nach TH (n= 4)	1,62±0,11*	0,80±0,01*	4,58±0,13	40,8±4,60*	8,9	81±10*	791±54*	9,8	2,34±0,61	1,22±0,11	0,42	0,97±0,15*	0,02±0,01
24 Std. nach TH (n= 6)	1,86±0,02	0,85±0,01	4,56±0,11	49,0±0,99*	10,8	83± 5*	996±48*	12,1	4,05±0,54	1,69±0,25	0,42	1,46±0,05*	0,05±0,02
48 Std. nach TH (n= 9)	1,86±0,01	0,50±0,04	4,79±0,34	43,7±3,01*	9,1	78± 2*	484±30*	6,2	4,10±0,12	1,33±0,12	0,32	1,20±0,[illegible]	0,03±0,03
72 Std. nach TH (n= 3)	1,80±0,01	0,68±0,03	6,89±0,04*	45,7±0,15*	6,6	49± 8*	287± 5	5,9	2,70±0,26	1,16±0,06	0,43	1,62±0,21	0 ± 0
5 Tage nach TH (n= 4)	2,00±0,02	0,45±0,01	7,22±0,19	59,3±1,27	8,2	50± 1*	272±22	5,4	3,76±0,16	1,00±0,14	0,27	1,65±0,13	0 ± 0
10 Tage nach TH (n= 5)	1,84±0,05	0,40±0,11	3,90±0,13*	45,4±1,61*	11,6	40± 3*	261±25	6,5	3,53±0,36	0,84±0,04	0,24	1,85±0,11	0,11±0,01

[1] mg / g Frischgewicht
[2] µmol P / h pro mg Protein bei 37°C
[3] µmol P / h pro mg Protein bei 37°C
[4] µmol P / h pro mg Protein bei 37°C
[5] nmol reduziertes 2-(p-jodophenyl)-3-p-nitrophenyl-5-phenyltetrazolium / h pro mg Protein bei 37°C

48. Stunde waren die Enzymaktivitäten der Alkalischen Phosphatase in der Plasmamembran relativ niedriger als im Homogenat.

Im Gegensatz zur Alkalischen Phosphatase fiel die Aktivität des ebenfalls plasmamembrangebundenen Enzyms 5'-Nucleotidase nach Teilhepatektomie ab. Bis auf wenige Ausnahmen zeigte sich dies sowohl für die Enzymaktivität im Homogenat als auch in den Membranfraktionen, so daß die relative Aktivität meist konstant blieb.

3.1.3.2 Bindung von Insulin und Glucagon an die Plasmamembran

Die Glucagonbindungskapazität an die Leberplasmamembran (Abbildung 4) war zwischen 12 Stunden und 5 Tagen nach Teilhepatektomie signifikant auf ein Viertel des Ausgangswertes erniedrigt. Am 10. Tag wurde die Ausgangskapazität wieder erreicht.

Im Gegensatz dazu veränderte sich die Insulinbindungskapazität während des gesamten Untersuchungszeitraums bis zum 10. Tag nach Teilhepatektomie nicht.

3.1.3.3 Aktivität der Adenylatcyclase in der Plasmamembran (Abbildung 5)

3.1.3.3.1 Basale Aktivität

Die unstimulierte Aktivität der Adenylatcyclase in der Plasmamembran war nach Teilhepatektomie deutlich vermindert, zwischen der 18. und 48. Stunde nach Teilhepatektomie signifikant auf etwa 25 % des Ausgangswertes. Nach

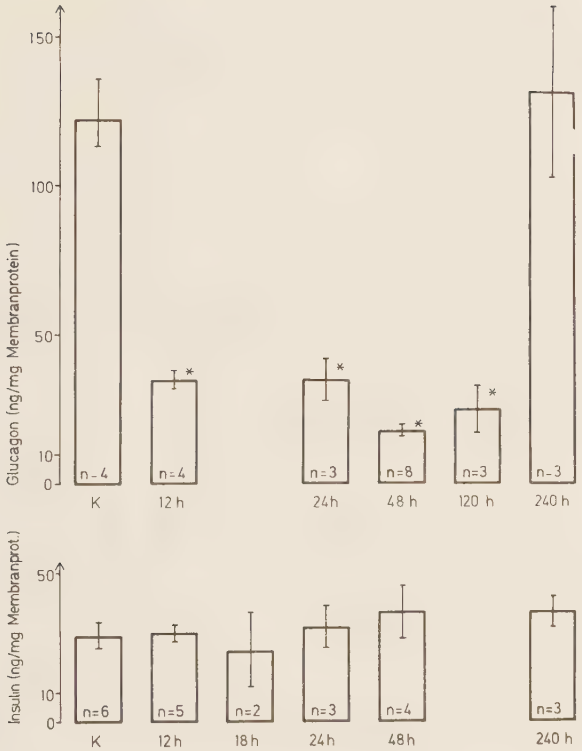


Abbildung 4: Glucagon- und Insulinbindungskapazität an die Leberplasmamembran stoffwechselgesunder Ratten nach 2/3-Teilhepatektomie.

Die Angaben erfolgen als Mittelwerte ± SEM der in Klammern angegebenen Fallzahlen. Die Bindungskapazität ist sowohl für Insulin als auch für Glucagon in ng/ml Membranprotein aufgeführt. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte nach Student's t-Test für unverbundene Stichproben.

* = signifikant gegenüber dem Kontrollwert auf dem $p < 0,01$ - Niveau.

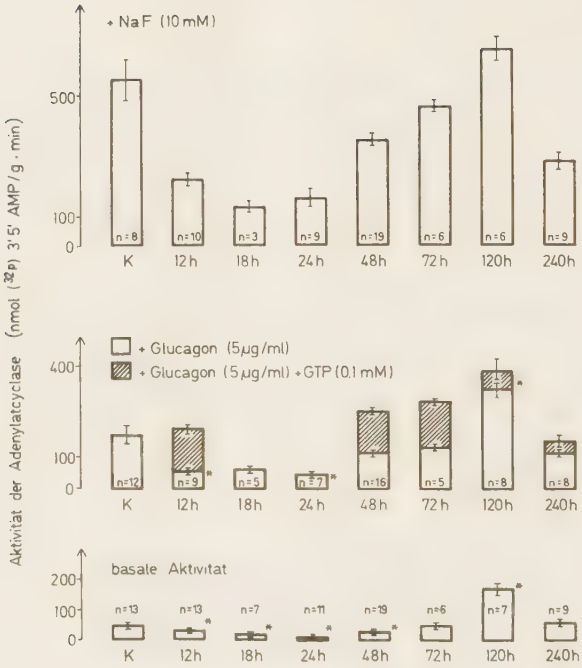


Abbildung 5: Enzymaktivität der Adenylatcyclase in Plasmamembranfraktionen der Leber nach 2/3-Teilhepatektomie bei stoffwechselgesunden Ratten.

Die Angaben erfolgen als Mittelwerte ± SEM der in Klammern angegebenen Fallzahlen. Die Enzymaktivität ist in nmol (^{32}P)3'5'AMP/g·min angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte nach Student's t-Test für unverbundene Stichproben.

* = signifikant gegenüber dem Kontrollwert auf dem $p < 0{,}01$ Niveau.

72 Stunden war die Enzymaktivität wieder auf Ausgangsniveau und am 5. Tag signifikant erhöht. Am 10. Tag war erneut der Ausgangswert erreicht.

3.1.3.3.2 Stimulation mit Glucagon

Die mit Glucagon stimulierbare Aktivität der Adenylatcyclase war 12 bis 24 Stunden nach Teilhepatektomie auf annähernd 25 % der Ausgangsaktivität erniedrigt. Analog zur basalen Aktivität wurde auch hier eine signifikante Aktivitätserhöhung nach 5 Tagen erreicht. Am 10. Tag nach Teilhepatektomie war die Glucagon-stimulierte Aktivität der Adenylatcyclase wieder im Ausgangsniveau.

3.1.3.3.3 Stimulation mit Glucagon bei Zusatz von GTP

Für die Stimulierbarkeit der Adenylatcyclase mit Glucagon in Gegenwart von GTP lagen fortlaufende Werte erst ab der 48. Stunde nach Teilhepatektomie vor. Zu allen untersuchten Zeitpunkten kam es dabei zu einer deutlichen Aktivitätszunahme gegenüber der alleinigen Stimulation mit Glucagon. Das Verhältnis der Enzymaktivitäten nach Stimulation mit Glucagon in Anwesenheit von GTP zu der Stimulation mit Glucagon allein schwankte um den Faktor 2,2.

3.1.3.3.4 Stimulation mit NaF

Wie bei Basalwert und nach Stimulation mit Glucagon fand sich auch hier ein dreigeteiltes Aktivitätsverhalten der Adenylatcyclase nach Teilhepatektomie. Einem Aktivitätsverlust auf etwa 25 % des Ausgangswertes, der bei 18 Stunden maximal ausgeprägt war, folgte eine Aktivitätszunahme.

Bei 72 Stunden wurde die Ausgangsaktivität erneut erreicht. Im Gegensatz zur basalen oder mit Glucagon stimulierten Aktivität fand sich nach 5 Tagen keine signifikante Erhöhung. Am 10. Tag zeigte sich hier sogar eine signifikante Aktivitätsminderung.

3.1.3.3.5 Stimulation mit Prostacyclin

Bei acht Testreihen mit Prostacyclinzugabe (Konzentration 10^{-7} bis 10^{-2} g/ml) in das Inkubationsmedium bei Kontrollen und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Teilhepatektomie zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der basalen Adenylatcyclaseaktivität.(Ergebnisse sind nicht abgebildet)

3.1.3.3.6 Vergleich der Aktivitäten der Adenylatcyclase in der Plasmamembran und im Homogenat (nicht abgebildet)

Da die Adenylatcyclase ein ebenfalls plasmamembrangebundenes Enzym ist, kann der Vergleich der Enzymaktivitäten von Ausgangshomogenat und Plasmamembranfraktion ebenfalls etwas über den Anreicherungsfaktor der Membranen aussagen (vgl. Markerenzyme). Bei sechs Messungen von Basalwerten, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Teilhepatektomie sowie bei diabetischen Tieren durchgeführt wurden, fand sich beim Vergleich von Plasmamembran zum Homogenat eine etwa 15fach gesteigerte Aktivität in den Plasmamembranen. Dies entsprach in etwa der relativen spezifischen Anreicherung von 5'-Nucleotidase und Alkalischer Phosphatase. Bei zwei Versuchen mit NaF ergab sich eine Aktivitätszunahme um das 50fache; bei einem Ansatz mit Glucagon als Stimulant der Adenylatcyclaseaktivität war die Zunahme etwa 35fach.

3.2 Diabetische Tiere

3.2.1 Klinische Charakterisierung (Tabelle V)

Durch Injektion von 80 mg Streptozotocin x HCl pro 100 g Körpergewicht konnte bei allen Ratten eine diabetische Stoffwechsellage mit Blutzuckerspiegeln zwischen 24 und 28 mmol/l (in gefüttertem Zustand) erzielt werden. Im Verlauf der folgenden Woche nahmen die Tiere im Mittel nicht an Gewicht zu. Der bei den diabetischen Kontrolltieren (ohne Teilhepatektomie) beobachtete geringe Gewichtsabfall gegenüber dem Gewicht zum Zeitpunkt der Streptozotocininjektion ist weitgehend auf das nächtliche Fasten vor dem Präparationstag zurückzuführen (vgl. stoffwechselgesunde Tiere, Tabelle IV). Vom klinischen Aspekt waren die meisten Tiere in einem relativ schlechten Zustand mit Exsikkose, struppigem Fell und teils apathischem Verhalten.

Bei den teilhepatektomierten diabetischen Tieren lag das Körpergewicht bis zum 4. postoperativen Tag relativ einheitlich bei etwa 90 % des Gewichts zum Zeitpunkt der Teilhepatektomie, das dem jeweiligen Kontrollgewicht bei der Streptozotocininjektion entsprach. Die Teilhepatektomie schien folglich auch für die diabetischen Tiere keine zusätzliche größere Belastung zu bedeuten.

Das Lebergewicht hatte 24 Stunden nach Teilhepatektomie gegenüber 12 Stunden bereits zugenommen. Zwischen dem 4. und 10. Tag wurde das ursprüngliche Lebergewicht wieder erreicht.

Tabelle V Körper- und Lebergewicht bei diabetischen Ratten in Beziehung zur Teilhepatektomie (TH)

Die Angaben erfolgen als Mittelwert ± SEM

		Körpergewicht (g) bei Strepto.-Injektion	Körpergewicht (g) bei Präp.	Lebergewicht (g) bei TH (entnommener Teil)	Lebergewicht (g) bei Präp.
Kontrolltiere ohne TH	(n = 24)	161 ± 2	149 ± 3	-	5,5 ± 0,2
Zeitabstand nach TH					
12 Std.	(n = 23)	164 ± 4	146 ± 3	4,5 ± 0,1	2,3 ± 0,1
24 Std.	(n = 28)	162 ± 3	146 ± 2	4,3 ± 0,1	3,1 ± 0,1
48 Std.	(n = 12)	156 ± 4	146 ± 4	-	3,2 ± 0,3
4 Tage	(n = 16)	172 ± 2	154 ± 3	5,3 ± 0,1	4,6 ± 0,1
10 Tage	(n = 12)	152 ± 3	156 ± 4	5,4 ± 0,2	6,6 ± 0,1

Durch die Teilhepatektomie wurde das reduzierte klinische Verhalten der diabetischen Ratten nicht zusätzlich beeinträchtigt. Dies bestätigte auch die geringe Absterberate von nur 2 Prozent.

3.2.2 Blutuntersuchungen

3.2.2.1 Leberspezifische Serumenzyme

Die Enzymaktivitäten der GOT und GPT im Plasma (Abbildung 6) waren 12 Stunden nach Teilhepatektomie stark erhöht und zwar um etwa das 25fache. Bei rascher Aktivitätsminderung wurde bei etwa 4 Tagen das Ausgangsniveau wieder erreicht.

Ähnlich war der Enzymverlauf der LDH (Abbildung 7) im Plasma, allerdings mit Rückkehr zur Ausgangsaktivität bereits bei 48 Stunden. Die maximale Steigerung bei 12 Stunden betrug hier das 7fache.

Die Alkalische Phosphatase (Abbildung 7) blieb nach einem Aktivitätsanstieg um das Doppelte bei 12 Stunden auch bei 24 Stunden auf diesem Niveau. Die weiteren Werte unterschieden sich nicht mehr signifikant vom Ausgangswert.

3.2.2.2 Blutglucose, Insulin und Glucagon im Plasma

Das Verhalten von Blutzucker, Insulin und Glucagon bei den diabetischen Ratten nach Teilhepatektomie ist in Abbildung 8 aufgezeichnet.

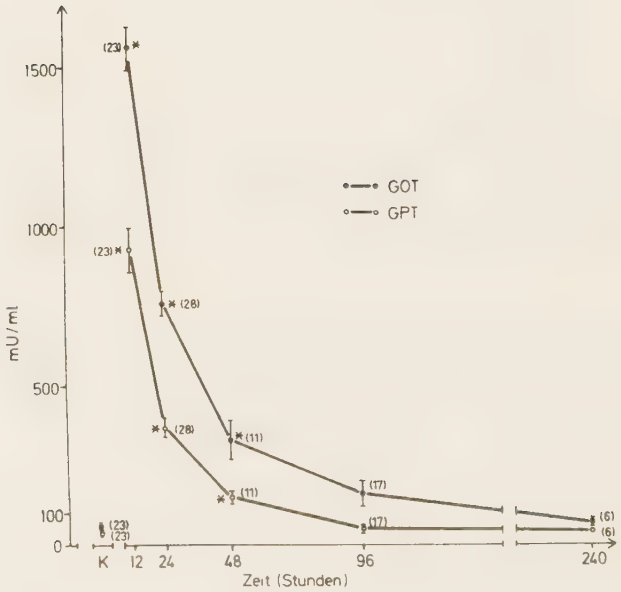


Abbildung 6: Enzymaktivität der GOT und GPT im Plasma diabetischer Ratten nach 2/3-Teilhepatektomie.
Die Angaben erfolgen als Mittelwerte ± SEM der in Klammern angegebenen Fallzahlen. Die Enzymeinheiten sind als mU/ml angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte nach Student's t-Test für unverbundene Stichproben.

* = signifikant gegenüber dem Kontrollwert auf dem $p < 0.001$ Niveau.

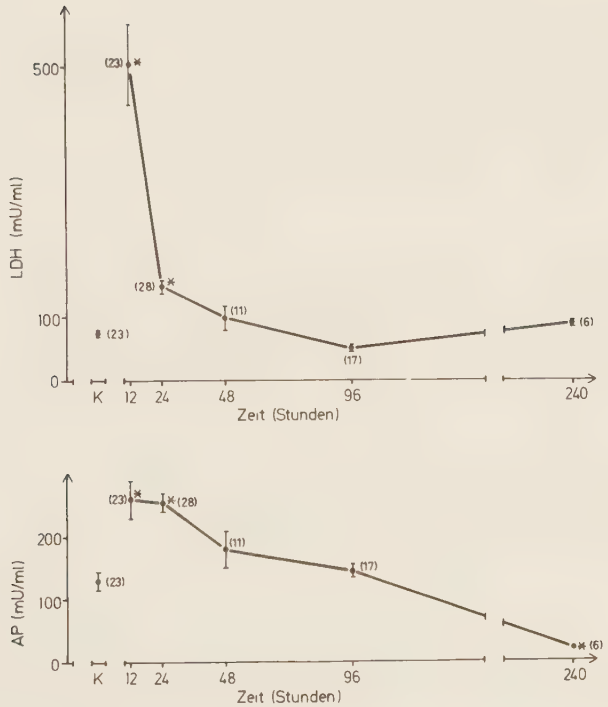


Abbildung 7: Enzymaktivitäten der LDH und AP im Plasma diabetischer Ratten nach 2/3-Teilhepatektomie.
Die Angaben erfolgen als Mittelwerte ± SEM der in Klammern angegebenen Fallzahlen. Die Enzymeinheiten sind als mU/ml angegeben, die Berechnung der Signifikanz erfolgte nach Student's t-Test für unverbundene Stichproben.

* = signifikant gegenüber dem Kontrollwert auf dem $p < 0.001$ Niveau.

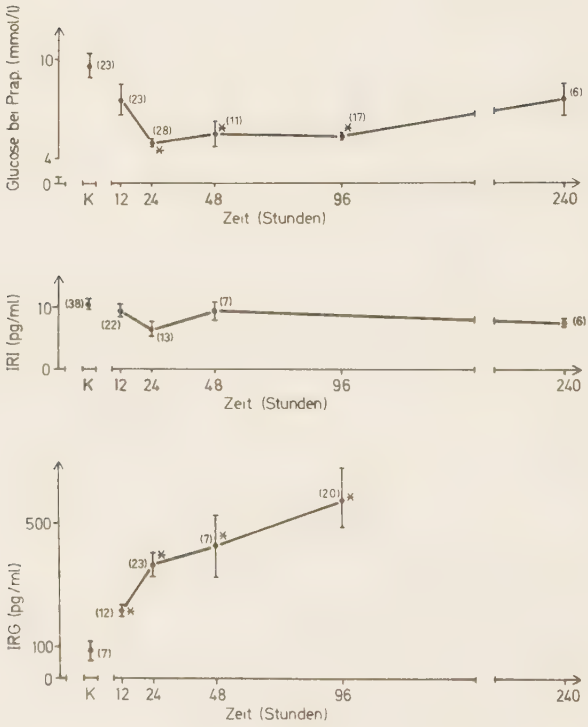


Abbildung 8: Blutzücker, Insulin (IRI) und Glucagon (IRG) im Plasma diabetischer Ratten nach 2/3-Teilhepatektomie.

Die Angaben erfolgen als Mittelwerte ± SEM der in Klammern angegebenen Fallzahlen. Die Glucose ist in mmol/ml aufgeführt, Insulin in µU/ml und Glucagon in pg/ml. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte nach Student's t-Test für unverbundene Stichproben.

* = signifikant auf dem $p < 0{,}001$-Niveau gegenüber dem Kontrollwert.

Der Blutzucker der diabetischen Kontrolltiere (eine Woche nach Diabetes-Induktion durch Streptozotocin) lag, bedingt durch das Fasten über Nacht, bei weniger als der Hälfte der Spiegel im gefütterten Zustand (9,5 mmol/l im Vergleich zu 24 mmol/l). Nach Teilhepatektomie lagen die Blutzuckerspiegel im Zeitraum zwischen 24 Stunden und 4 Tagen nach der Operation um 5 mmol/l und bei 10 Tagen in der Höhe der diabetischen Kontrollen ohne Teilhepatektomie.

Die Glucagonkonzentration im Plasma zeigte nach der Teilhepatektomie einen deutlichen Anstieg, der sich nahezu kontinuierlich bis mindestens 4 Tage (hier Ende der Untersuchungszeit) fortsetzte und maximal das 6fache des Ausgangswertes betrug.

Der bei den diabetischen Tieren bereits deutlich erniedrigte Plasmainsulinspiegel blieb während des gesamten Beobachtungszeitraumes auf diesem erniedrigten Niveau.

3.2.3 Untersuchungen an Leberplasmamembranen

3.2.3.1 Membranprotein und -markerenzyme der Membranpräparation (Tabelle VI)

Bei der Ausbeute an Membranprotein (ca. 0,50 mg) pro Gramm Leberfrischgewicht zeigten sich zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Teilhepatektomie keine deutlichen Unterschiede.

Die absoluten und relativen Enzymaktivitäten der Glu-

Tabelle VI: Vergleich von Protein und von Markerenzymen für Plasmamembranen, Endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien in Homogenaten und Plasmamembranfraktionen der Leber nach 2/3-Teilhepatektomie bei diabetischen Ratten

Hom=Homogenat, PM=Plasmamembranfraktion, RSA=relative spezifische Aktivität
Die Angaben für Hom und PM erfolgen als Mittelwert ± SEM
RSA gibt den Anreicherungsfaktor zwischen PM und Hom wieder
*p=0,01 nach Student's t-Test für unverbundene Stichproben

	Protein[1]		5'-Nucleotidase[2]			Alkalische Phosphatase[3]			Glucose-6-Phosphatase[4]			Succinatdehydrogenase[5]	
	Hom	PM	Hom	PM	RSA	Hom	PM	RSA	Hom	PM	RSA	Hom	PM
Kontrolle ohne TH (n=6)	1,99±0,06	0,58±0,10	3,28±1,03	29,3±6,38	8,7	23±2	332±66	14,3	3,17±0,51	1,27±0,08	0,40	2,57±0,12	0,36±0,13
12 Std. nach TH (n=3)	2,02±0,06	0,77±0,17	4,19±0,08	34,7±2,55	8,3	85±4*	1029±46*	12,2	7,86±0,87*	0,87±0,04	0,11	2,57±0,18	0,25±0,14
24 Std. nach TH (n=5)	1,84±0,06	0,39±0,07	3,58±0,48	41,5±6,79	11,6	72±3*	1278±86*	17,8	7,39±1,91	1,06±0,18	0,14	2,57±0,53	0,39±0,14
48 Std. nach TH (n=3)	1,80±0,08	0,63±0,04	4,21±0,16	44,2±8,98	10,5	78±1*	988±47*	12,7	5,21±1,14	1,14±0,10	0,22	3,27±0,01	0,20±0,06
4 Tage nach TH (n=5)	1,81±0,05	0,27±0,14	5,57±0,20	40,7±7,08	9,5	78±3*	735±77*	9,5	6,90±0,23*	1,61±0,38	0,23	2,47±0,12	0,09±0,09
10 Tage nach TH (n=2)	1,87±0,13	0,19±0,17	3,41±0,11	23,6±7,57	6,9	40±3	390±85	9,9	3,38±0,19	1,34±0,00	0,53	1,25±0,25*	0 ± 0

[1] mg / g Frischgewicht
[2] µmol P / h pro mg Protein bei 37°C
[3] µmol P / h pro mg Protein bei 37°C
[4] µmol P / h pro mg Protein bei 37°C
[5] nmol reduziertes 2-(p-jodophenyl)-3-p-nitrophenyl-5-phenyltetrazolium / h pro mg Protein bei 37°C

cose-6-Phosphatase und der Succinatdehydrogenase waren ebenfalls zu allen Zeitpunkten relativ gleich und unterschieden sich auch nicht von denen der diabetischen Kontrolltiere.

Auch die absolute und relative Aktivität des plasmamembranständigen Enzyms 5'-Nucleotidase wich zu keinem Zeitpunkt nach Teilhepatektomie signifikant vom Kontrollwert ab.

Die ebenfalls plasmamembrangebundene Alkalische Phosphatase zeigte sowohl im Homogenat wie auch in der Plasmamembranfraktion im Zeitraum zwischen 12 Stunden und 4 Tagen einen absoluten Aktivitätsanstieg, ähnlich dem bei stoffwechselgesunden Tieren. Die relative spezifische Aktivität der Alkalischen Phosphatase blieb aber vergleichbar zu den diabetischen Kontrollen sowie zu den stoffwechselgesunden teilhepatektomierten Ratten (Tabelle IV).

3.2.3.2 Bindung von Insulin und Glucagon an die Plasmamembran

Die Glucagonbindungskapazität an die Plasmamembran (Abbildung 9) erfuhr nach Teilhepatektomie keine signifikante Änderung gegenüber dem Kontrollwert.

Im Gegensatz dazu fiel die Insulinbindungskapazität nach Teilhepatektomie signifikant auf etwa ein Viertel der Ausgangskapazität bei 12 Stunden ab und befand sich auch bei Beobachtungsende am 10. Tag nach Teilhepatektomie auf diesem Niveau.

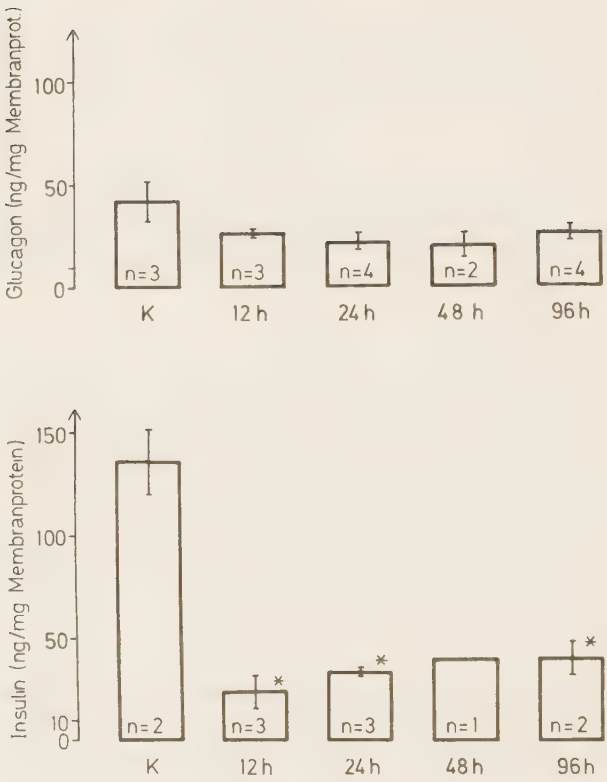


Abbildung 9: Glucagon- und Insulinbindungskapazität an die Leberplasmamembran diabetischer Ratten nach 2/3-Teil-hepatektomie.

Die Angaben erfolgen als Mittelwerte ± SEM der in Klammern angegebenen Fallzahlen. Die Bindungskapazität ist sowohl für Insulin als auch für Glucagon in ng/ml Membranprotein aufgeführt. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte nach Student's t-Test für unverbundene Stichproben.

* = signifikant gegenüber dem Kontrollwert auf dem $p < 0{,}01$-Niveau.

3.2.3.3 Aktivität der Adenylatcyclase in der Plasmamembran (Abbildung 10)

3.2.3.3.1 Basale Aktivität

Die Enzymaktivität der Adenylatcyclase war zwischen der 12. und 48. Stunde nach Teilhepatektomie bis auf maximal 20 % des Kontrollwertes vermindert. Am 4. Tag lag die Aktivität der Adenylatcyclase im Niveau des Kontrollwertes.

3.2.3.3.2 Stimulation mit Glucagon

Im Prinzip ähnlich dem Verhalten der basalen Aktivität stellte sich der Verlauf der Enzymaktivität bei Stimulation mit Glucagon dar. Eine Aktivitätsminderung auf minimal 10 % des Kontrollwertes bei 24 Stunden folgte eine Zunahme der Aktivität, die am 4. Tag das Kontrollniveau wieder erreichte.

3.2.3.3.3 Stimulation mit Glucagon bei Zusatz von GTP

Die Zugabe von GTP zum Inkubationsmedium bewirkte auch bei den diabetischen Ratten eine Aktivitätszunahme der Adenylatcyclase bei Glucagonstimulation, ohne daß das charakteristische Verhalten der Adenylatcyclaseaktivität im Verlauf nach Teilhepatektomie verändert wurde. Der zusätzliche Aktivitätsanstieg der Adenylatcyclase nach Glucagonstimulation in Anwesenheit von GTP im Vergleich zur alleinigen Glucagonstimulation betrug zu allen untersuchten Zeitpunkten etwa das 2,7fache.

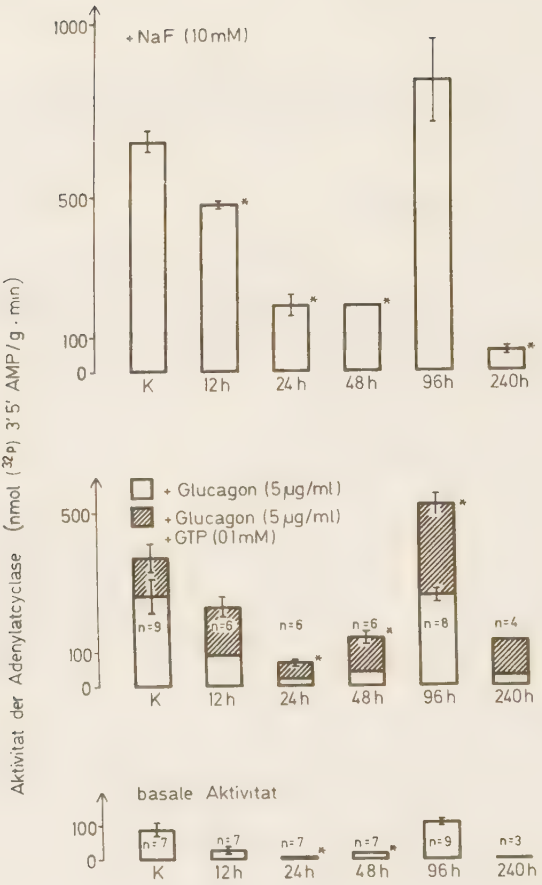


Abbildung 10: Enzymaktivität der Adenylatcyclase in Plasmamembranfraktionen der Leber nach 2/3-Teilhepatektomie bei diabetischen Ratten.

Die Angaben erfolgen als Mittelwerte ± SEM der in Klammern angegebenen Fallzahlen. Die Enzymaktivität ist in nmol (^{32}P)3'5'AMP/g · min angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgt nach Student's t-Test für unverbundene Stichproben.

* = signifikant gegenüber dem Kontrollwert auf dem $p < 0,01$-Niveau.

3.2.3.3.4 Stimulation mit NaF

Bei der Stimulation der Adenylatcyclase mit NaF war der Aktivitätsabfall bis zu 24 Stunden nach Teilhepatektomie nicht so ausgeprägt, nämlich nur auf 30 % des Ausgangswertes. Auch hier wurde der Wiederanstieg der Aktivität am 4. Tag mit Erreichen des Ausgangswertes abgeschlossen.

3.3 Verleich der Ergebnisse bei stoffwechselgesunden und diabetischen Tieren nach Teilhepatektomie

3.3.1 Klinische Charakterisierung

Im Gegensatz zu den stoffwechselgesunden Tieren begann bei den diabetischen die Gewichtsrestitution nach der Teilhepatektomie später (nach 4 Tagen gegenüber 48 Stunden) und auch der Ausgangswert wurde später erreicht (nach 10 Tagen gegenüber 6 Tagen).

Das Gewicht der entnommenen zwei Drittel der Leber war bei beiden Gruppen nahezu gleich. Die Leberregeneration, gemessen an dem Leberfrischgewicht, erfolgte bei den diabetischen (nach 10 Tagen 75 % des Ausgangsgewichtes gegenüber 88 % bei den gesunden) etwas langsamer.

3.3.2 Blutuntersuchungen

3.3.2.1 Leberspezifische Serumenzyme

Bei den diabetischen Tieren (am 7. Tag nach Diabetesauslösung durch Streptozotocin) ergaben sich signifikant erhöhte Aktivitäten der beiden Transaminasen im Plasma. Die Aktivitäten der LDH und der Alkalischen Phosphatase waren hingegen unverändert mit Ausnahme der verzögerten Rückkehr der Alkalischen Phosphatase zur Ausgangsaktivität bei den diabetischen Tieren.

3.3.2.2 Blutglucose, Insulin und Glucagon im Plasma

Im Gegensatz zu den stoffwechselgesunden Tieren, bei denen die Blutglucose im Verlauf nach der Teilhepatektomie keine signifikanten Änderungen aufwies, sanken bei den diabetischen Ratten die basal um 75 % höheren Spiegel 24 Stunden nach der Teilhepatektomie auf signifikant niedrigere Werte im Vergleich zu den gesunden Tieren ab.

Trotz eines vom Aspekt her völlig anderen Kurvenverlaufs ließen sich bei den Plasmaglucagonkonzentrationen keine signifikanten Unterschiede zwischen stoffwechselgesunden und diabetischen Kontrolltieren nach Teilhepatektomie ermitteln.

Das Plasmainsulin fiel von deutlich höheren Ausgangskonzentrationen bei den stoffwechselgesunden Tieren (etwa das Doppelte) bis 24 Stunden nach Teilhepatektomie auf Werte ab, die sich von denen der diabetischen Ratten, die nur einen geringen Abfall verzeichneten, bis zum 4.Tag nicht mehr unterschieden.

3.3.3 Untersuchungen an Leberplasmamembranen

3.3.3.1 Membranprotein und -markerenzyme der Membranpräparation

Die Aktivitäten der plasmamembrangebundenen Enzyme 5'-Nucleotidase und Alkalische Phosphatase in der Membran verhielten sich bei stoffwechselgesunden und diabetischen Tieren nach Teilhepatektomie nicht signifikant unterschiedlich. Lediglich die Aktivität der 5'-Nucleotidase war bei den stoffwechselgesunden Kontrollen signifikant höher als bei allen anderen Gruppen.

Auch der Grad der Verunreinigung der Plasmamembranfraktionen mit Endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien wies keine bedeutenden Unterschiede auf. Während die Aktivitäten der Glucose-6-Phosphatase sowohl absolut als auch relativ bei diabetischen und stoffwechselgesunden Tieren übereinstimmten, lagen die Aktivitäten der Succinatdehydrogenase bei den diabetischen höher. Da aber die Erhöhung sowohl Homogenat als auch Plasmamembranfraktion betraf, bleib die relative spezifische Anreicherung gleich.

3.3.3.2 Bindung von Insulin und Glucagon an die Plasmamembran

Die Bindungskapazitäten bei den Kontrolltieren ohne Teilhepatektomie zeigten sich unterschiedlich: Bei stoffwechselgesunden Tieren war die Bindungskapazität für Glucagon, bei diabetischen für Insulin deutlich erhöht. Im weiteren Verlauf nach einer Teilhepatektomie fanden sich sowohl bei der Glucagon- als auch bei der Insulinbindungskapazität bis zum Ende des Beobach-

tungszeitraumes (10 Tage bzw. sogar 20 Tage) keine signifikant voneinander unterschiedenen absoluten Werte zwischen stoffwechselgesunden und diabetischen Tieren.

3.3.3.3 Aktivität der Adenylatcyclase in der Plasmamembran

Zum Vergleich mit den Adenylatcyclaseaktivitäten stoffwechselgesunder Tiere wurden die Ergebnisse bei diabetischen Ratten herangezogen, die mit der Methode nach White gewonnen wurden (Begründung siehe bei **Ergebnissen**). Diese stimmten auch hinsichtlich Kurvenverlauf und Absolutwerten gut mit denen der stoffwechselgesunden überein. Sowohl bei den basalen als auch bei den durch NaF bzw. Glucagon in Anwesenheit von GTP stimulierten Aktivitäten fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen stoffwechselgesunden und diabetischen Tieren nach Teilhepatektomie. Demgegenüber waren die mit Glucagon stimulierten Aktivitäten mit Ausnahme der Kontrollwerte signifikant unterschieden, wobei bis auf den 12-Stunden-Wert die der stoffwechselgesunden Ratten höher lagen.

4 DISKUSSION

Unser Wissen über die Auswirkungen, die eine endogene Änderung der Hormonplasmakonzentration auf die Bindung des Hormons an seinen spezifischen Rezeptor in der Plasmamembran des Erfolgsorgans hervorruft, und über die Zusammenhänge zwischen Hormonbindung und hormonell stimulierter Enzymaktivität ist noch sehr unvollständig. Am Beispiel der Hormone Insulin und Glucagon, bei denen die Informationsübertragung in die Leberzelle jeweils über eine Bindung an spezifische Rezeptoren der Leberplasmamembran und eine nachfolgende Beeinflussung der Enzymaktivität der Adenylatcyclase erfolgt (63,64,66, 26,33), untersuchte eine Reihe von Arbeitsgruppen die Verbindung der Komponenten der Informationsübertragung.

Eingehende in vivo- und in vitro-Untersuchungen liegen zur Wechselwirkung zwischen Insulinplasmaspiegel und Insulinrezeptor an verschiedenen Geweben vor (4,22,34, 73, Literaturübersicht bei Bachmann 5). Rodbell und Mitarbeiter (63,64,66), Houslay und Mitarbeiter (29,16) und andere zeigten an in vitro-Versuchen mit der durch das Hormon Glucagon stimulierten Adenylatcyclase, daß eine Reihe von Faktoren einen nicht-linearen Zusammenhang zwischen Glucagonbindung und Glucagon-stimulierter Adenylatcyclaseaktivität hervorrufen. An modifizierenden Einflüssen auf diesen Übertragungsmechanismus zwischen Glucagonrezeptor und katalytische Einheit der Adenylatcyclase wurden die Lipidzusammensetzung der Plasmamembran (Houslay 29,30; Dipple 16) und der Gehalt an Guanylnucleotiden in der Membran selbst (Rodbell und Mitarbeiter 63,64,66:, Kimura 36,37) gefunden.

Anhand von zwei Versuchsreihen mit ausgeprägten endogenen Insulin- und Glucagonschwankungen wurden in dieser Arbeit in vivo an Ratten die Wechselwirkungen zwischen Hormonplasmakonzentration, Hormonbindung und hormonell stimulierter Enzymaktivität untersucht.

Für eine erste Versuchsreihe wurde die Rattenleber nach Teilhepatektomie ausgewählt, bei der nach operativer Entfernung von zwei Dritteln ein starker Anstieg des Pankreashormons Glucagon im Plasma in der Literatur (5,11,42,43,52,71) beschrieben worden war. Die zweite Versuchsreihe verband die Plasmahormonänderungen nach Teilhepatektomie mit denen einer vorwegbestehenden diabetischen Stoffwechsellage. Beim Streptozotocin-induzierten Diabetes findet sich neben einer Hyperglucagonämie ein absoluter Insulinmangel (14,67,32,5).

Da die vorliegenden Untersuchungen an der Leber erfolgten, wurden routinemäßig die leberspezifischen Enzyme GOT, GPT, LDH und Alkalische Phosphatase im Blutplasma bestimmt. Damit sollte erstens die Vergleichbarkeit der einzelnen Rattenlebern gewährleistet und zweitens Aufschluß über etwaige toxische Funktionsstörungen gewonnen werden.

Die erwähnten Enzymbestimmungen ergaben für stoffwechselgesunde Tiere keine Schädigung der Leberzellen. Der Aktivitätsanstieg aller Enzyme, der unmittelbar auf eine Teilhepatektomie folgte und den auch Bachmann (5) beobachtete, beruht auf dem nekrotisierenden Geweberest, der bei einer Teilhepatektomie aus technischen Gründen in der Bauchhöhle verbleiben muß. Dafür sprechen auch licht-

mikroskopische Untersuchungen der intakt gebliebenen Restleber, bei denen Bachmann (5) die Einzelzelle unversehrt fand.

Für die bei diabetischen Tieren leicht erhöhten Enzymaktivitäten von GOT und für die verzögerte Rückkehr der Aktivität der Alkalischen Phosphatase zur Norm nach Teilhepatektomie lassen sich zwei mögliche Ursachen diskutieren und zwar erstens eine direkte Streptozotocinintoxikation der Zellen und zweitens eine Diabetesbedingte Veränderung. Die letztere Ursache ist als die wahrscheinlichere anzusehen. Bachmann (5) fand nämlich keine höheren Aktivitäten für GOT und GPT bei Tieren, die ihren gleichstarken Diabetes nur maximal 6 Tage und damit nicht so lange wie die hier verwendeten hatten. Deshalb ist eine Intoxikation durch das in vivo verabreichte Streptozotocin eher unwahrscheinlich, wenngleich dies nicht absolut ausgeschlossen werden kann. Für eine Diabetes-bedingte Schädigung sprechen ferner die aus der menschlichen Pathologie bekannten Leberschäden bei länger dauerndem, schlecht eingestelltem Diabetes.

Insgesamt folgt aus der Bestimmung leberspezifischer Enzyme im Blutplasma sowohl für stoffwechselgesunde als auch für diabetische Ratten, daß ihre Lebern weitgehend vergleichbar waren. Es soll jedoch noch einmal darauf hingewiesen werden, daß bei den diabetischen Tieren zum Zeitpunkt der Teilhepatektomie eine geringe Erhöhung der gemessenen leberspezifischen Serumenzyme festgestellt werden konnte. Deshalb muß davon ausgegangen werden, daß bei diesen Tieren zu diesem Zeitpunkt eine geringe Leberschädigung vorlag, die natürlich im Rahmen der weiterführenden Untersuchungen möglicherweise mitberücksichtigt werden muß.

Da sowohl die Hormonbindung als auch die Aktivitätsmessung der Adenylatcyclase an der isolierten Leberplasmamembran erfolgte, kam der Überprüfung der Membranpräparation hinsichtlich Reinheit und Vergleichbarkeit der isolierten Membranfraktionen untereinander erhebliche Bedeutung zu. Hierzu wurden sogenannte Membran-Markerenzyme routinemäßig bei jeder Präparation bestimmt.

Die gleicherweise für die Kontrolltiere ohne Teilhepatektomie und für den gesamten Beobachtungszeitraum nach Teilhepatektomie bei stoffwechselgesunden Tieren konstant niedrigen absoluten und relativen Enzymaktivitäten der Succinatdehydrogenase und Glucose-6-Phosphatase in der Plasmamembranfraktion zeigten eine nur geringe Verunreinigung der Plasmamembranen mit Endoplasmatischem Retikulum bzw. Mitochondrien an. Bei diabetischen Ratten war dagegen bei vergleichbaren Glucose-6-Phosphatase-Aktivitäten eine erhöhte Aktivität der Succinatdehydrogenase im Leberhomogenat und in der Plasmamembranfraktion festzustellen. Bei den Plasmamembrangebundenen Enzymen ergab sich sowohl für gesunde als auch für diabetische Ratten bei allgemein nicht signifikant unterschiedenen Werten ein absoluter Aktivitätsanstieg der Alkalischen Phosphatase nach Teilhepatektomie. Die Aktivität der 5'-Nucleotidase änderte sich dagegen bei diabetischen Tieren nach Teilhepatektomie nicht gegenüber dem Wert der Kontrolltiere ohne Teilhepatektomie. Ausgehend von einem höheren Niveau bei den Kontrolltieren unterschieden sich bei diesem Enzym die Aktivitäten der gesunden Tiere nach Teilhepatektomie nicht gegenüber denen der diabetischen Ratten. Da

allgemein jeweils gleichartige Aktivitätsänderungen auch im Homogenat gemessen werden konnten, blieb die relative spezifische Aktivität (RSA) gleich im Sinne einer von Präparation zu Präparation vergleichbaren Membrananreicherung.

Damit konnte für die weiteren Untersuchungen an der Leberplasmamembran davon ausgegangen werden, daß die einzelnen Membranpräparationen von stoffwechselgesunden und diabetischen Ratten sowohl für Kontrolltiere ohne Teilhepatektomie als auch für Tiere mit verschieden langer Überlebenszeit nach Teilhepatektomie erstens vom Grad der Verunreinigung mit anderen Zellorganellen und zweitens auch vom Grad der Anreicherung her untereinander vergleichbar waren. Methodisch bedingte Unterschiede im Verhalten der Hormonbindung und Enzymaktivität konnten damit weitgehend ausgeschlossen werden.

Auf die Ursachen des gemessenen absoluten Aktivitätsanstiegs der Alkalischen Phosphatase in der Leberplasmamembranfraktion, den auch Wright (81) beobachtete, und auf die bei diabetischer Stoffwechsellage insgesamt erhöhten Succinatdehydrogenaseaktivitäten und niedrigeren absoluten 5'-Nucleotidase-Aktivitäten der Membranen bei Kontrolltieren ohne Teilhepatektomie (vgl. Soman (74) und Bachmann (5)) konnte im Rahmen dieser Studie nicht eingegangen werden.

Eine wichtige Rolle beim Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit denen anderer Arbeitsgruppen spielten die unterschiedlichen Methoden der Plasmamembranpräparation.

Diese führen u.a. dazu, daß vielfach Membranen unterschiedlicher Dichte (und damit unterschiedlicher Gewebezusammensetzung (House 28) verwendet wurden. Eine Darstellung der Auswirkungen, die Membranen verschiedener Dichteklassen auf die Enzymaktivität der Adenylatcyclase ausüben, findet sich bei House (28). Die in der vorliegenden Arbeit benutzte, von Bachmann (6) modifizierte Membranpräparation nach Ray (60) lieferte Membranen, die, wie elektronenmikroskopische Untersuchungen von Bachmann (5) bestätigen, weitgehend aus den Lebersinusoiden stammen, an denen die Hormonbindungen stattfinden (House 28).

Wie für die Membranpräparation, gibt es auch für die Bestimmung der Adenylatcyclaseaktivität keine Standardmethode. Da die einzelnen Methoden sich stark in der cAMP-Wiederfindung und der Höhe des Testleerwertes unterscheiden, dürfte dies die sehr differierenden Ergebnisse der einzelnen Arbeitsgruppen zum Teil erklären. Bei den hier verwendeten modifizierten Methoden nach Salomon (68) bzw. White (80) wurden jeweils gute Werte für Leeraktivität und cAMP-Wiederfindung bestimmt (siehe Tabelle VII). Eine Darstellung der gebräuchlichsten Methoden findet sich im "Journal of Cyclic Nucleotides Research" 4, 1978.

Da, wie oben dargestellt, technisch bedingte Versuchseinflüsse weitgehend ausgeschlossen waren, ließen sich aus den in der vorliegenden Arbeit benutzten zwei Versuchsreihen mit endogenen Hormonplasmakonzentrationsschwankungen für das System Hormonplasmakonzentration - Hormonbindung an die Plasmamembran - hormonell stimulierte Enzymaktivität - drei Erkenntnisse ableiten.

Die erste Erkenntnis - und damit können zum Teil Ergebnisse in der Literatur bestätigt werden - aus den beiden in der vorliegenden Arbeit verwendeten Versuchsreihen - Teilhepatektomie bei stoffwechselgesunden und Teilhepatektomie bei diabetischen Tieren - ist, daß es eine gewisse Gesetzmäßigkeit in dem Verhältnis von Hormonplasmakonzentration, Hormonbindung und hormonell stimulierter Enzymaktivität zu geben scheint.

Es besteht eine inverse Korrelation zwischen Hormonplasmakonzentration und Hormonbindung und zwar erstens bei raschen und ausgeprägten Hormonplasmakonzentrationsänderungen und zweitens bei langdauerndem Einwirken einer pathophysiologisch geänderten Hormonplasmakonzentration.

Die erstere Möglichkeit läßt sich für stoffwechselgesunde und diabetische Ratten im Zeitraum von 12 bis 24 Stunden nach Teilhepatektomie demonstrieren, in dem ein starker Anstieg des Hormons Glucagon mit einer verminderten Glucagonbindung einhergeht. Für das Hormon Insulin wurde keine derartige Relation beobachtet. Möglicherweise fielen aber die Insulinplasmakonzentrationen nicht schnell genug ab, da der Insulinabfall im Gegensatz zum Glucagon erst protrahiert einsetzt.

Die inverse Korrelation zwischen Hormonplasmakonzentration und Hormonbindung bei langdauernder Einwirkung geänderter Hormonplasmakonzentrationen gilt sowohl für Glucagon wie für Insulin. Sie zeigt sich beim Vergleich zwischen gesunden und diabetischen Ratten, bei denen eine Erhöhung des Glucagonplasmaspiegels mit einer ver-

minderten Glucagonbindung und eine verminderte Insulinplasmakonzentration mit einer vermehrten Bindung einhergehen. Die inverse Korrelation unter diesen Bedingungen ist schon länger bekannt und an verschiedenen Organen (z.B. Fett- und Muskelgewebe) sowohl in vitro als auch in vivo vor allem für Insulin nachgewiesen (Literaturübersicht bei Bachmann 5).

Eine inverse Korrelation gibt es nicht nur zwischen Hormonplasmakonzentration und Hormonbindung, sondern auch zwischen Hormonplasmakonzentration und hormonell stimulierter Enzymaktivität. Für die Glucagonplasmakonzentration und die Glucagon-stimulierte Adenylatcyclaseaktivität findet sich diese Art der Verbindung zu allen Zeitpunkten nach Teilhepatektomie und zwar sowohl bei gesunden als auch bei diabetischen Tieren.

Die zweite Erkenntnis aus dieser Arbeit ist, daß zwischen den Komponenten des Systems Hormonplasmakonzentration - Hormonbindung - hormonell stimulierte Enzymaktivität und auf diese selbst modifizierende Faktoren einwirken, da unter verschiedenen Bedingungen (z.B.verschieden lange Zeitabschnitte nach Teilhepatektomie,Diabetes) die Beziehung der Komponenten untereinander nicht konstant ist.

Wie vielfältig diese Verbindungsmöglichkeiten der Komponenten des Systems untereinander waren, sei am Beispiel des Hormons Glucagon nach Teilhepatektomie bei gesunden Ratten gezeigt: Im Zeitraum von 12 bis 24 Stunden nach Teilhepatektomie fand sich gegenüber den Kontrolltieren ohne Teilhepatektomie eine ansteigende

Glucagonplasmakonzentration, begleitet von einer verminderten Glucagonbindung und einer verringerten Glucagon-stimulierten Adenylatcyclaseaktivität. Im folgenden Zeitraum von 24 Stunden bis zu 5 Tagen verringerte sich die Glucagon-Plasmakonzentration wieder bei gleichbleibend erniedrigter Bindung und ansteigender Adenylatcyclaseaktivität. Im letzten beobachteten Zeitraum (10 Tage und mehr nach Teilhepatektomie) blieb schließlich die Glucagonplasmakonzentration gleich, allerdings auf leicht erniedrigtem Niveau bei steigender Bindung und gleichbleibender Adenylatcyclaseaktivität. Ebenfalls vielfältig und nicht eindeutig sind die Zusammenhänge der Systemkomponenten bei diabetischen Tieren sowie beim Hormon Insulin.

Eine Erklärung für das oben gefundene, von Situation zu Situation verschiedene Verhalten der Komponenten des Systems Hormonplasmakonzentration - Hormonbindung - hormonellstimulierter Enzymaktivität liefert die Annahme modifizierend eingreifender Faktoren.

Eine wichtige Rolle scheinen bei diesen Faktoren Änderungen der Lipidzusammensetzung der Plasmamembran zu spielen. Rodbell (65) bewies dies in vitro für die Glucagonbindung, die nach Zugabe des lipidspaltenden Enzyms Phospholipase zum Test vermindert ist. In vivo könnte die Ursache des Bindungsabfalles die Verminderung der Lipide zu Gunsten von Lysolipiden sein, die die Bindung hemmen, wie Houslay (30) mit Lysophosphatidylcholin in physiologischer Konzentration ermittelte. Eben dieses Lysophosphatidylcholin fand Bachmann (7) signifikant in der Leberplasmamembran nach Teilhepatektomie

bei stoffwechselgesunden Ratten erhöht. Zu diesen Zeitpunkten wurde auch in der vorliegenden Arbeit die zu erwartende verminderte Bindung gefunden.

Die Lipidumgebung in der Plasmamembran bildet auch für die Adenylatcyclaseaktivität einen unverzichtbaren Bestandteil. Spezielle Arten von Lipiden sind für eine Aktivitätssteigerung bzw. -erhaltung von Bedeutung, nach Birnbaumer (9) z.B. allgemein die Phospholipide. Andere Untersucher diskutieren speziellere Unterarten der Phospholipide wie z.B. Phosphatidylserin (Levey 44), Phosphatidylinositol (Rethy 62) oder Cholin und dessen Derivate (Pekarthy 56). Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß nach Levey (44) verschiedene Hormone auch verschiedener Lipide bedürfen. Für Glucagon wird z.B. Phosphatidylserin und für die Catecholamine Monophosphatidylinositol benötigt. Nach Helmreich (25) und Louis (47) sind vor allem auch die hochungesättigten Fettsäuren von Bedeutung. Ihre Wirkung auf die Adenylatcyclase soll daher rühren, daß sie durch Konformationsänderung innerhalb der Membran auf die Enzymproteine einwirken (Helmreich 25, Louis 48) oder einen geänderten, enzymaktivierenden Membranspannungszustand bewirken (Pliego 59).

Die bei in vitro-Experimenten gewonnenen obigen Ergebnisse werden durch in vivo-Beobachtungen an Ratten erhärtet: In dem Zeitraum von 12 bis 24 Stunden nach Teilhepatektomie, in dem es zu einem starken Abfall der Glucagon-stimulierten Adenylatcyclaseaktivität kommt, tritt eine Leberverfettung ein (72,15,3,56,82,50,10), bei der sich die Fettsäurenzusammensetzung sowohl insgesamt als

auch hinsichtlich der Art der Hauptphosphoglyceride (Fex 20) ändert. Insbesondere sinkt der Anteil der Fettsäuren mit mehr als 18-C-Atomen, d.h. der nach Helmreich (vgl. oben) besonders wichtigen hochungesättigten, auf die Hälfte ab (Fex 20). Die Änderungen, die in der Gesamtleber gemessen wurden, lassen sich mit Vorsicht in ähnlichem Sinne auf die Plasmamembran übertragen, da Bachmann (7) bei Messungen der Lipidzusammensetzung der Plasmamembran etwa gleichartige Veränderungen vorfand.

Die Lipide können allerdings nur als einer unter mehreren modifizierend auf das System Hormonplasmakonzentration - Hormonbindung - hormonell stimulierter Enzymaktivität eingreifenden Faktoren gesehen werden. Dies zeigt sich daran, daß im Vergleich der stoffwechselgesunden zu den diabetischen Tieren, bei denen schon primär ähnliche Lipidveränderungen auftreten wie nach einer Teilhepatektomie (Chandramouli 13, Pilkis 58), die Glucagon-stimulierte Adenylatcyclaseaktivität der diabetischen Tiere nicht erniedrigt, sondern sogar geringfügig erhöht ist.

Einen weiteren Punkt, an dem die Regulation der Glucagonbindung ansetzt, stellt ein Nucleotid-bindendes Protein dar (Schlegel 69). Daran gebundenes GTP erhöht die Dissoziation des Hormons (Rodbell 66), indem es die Rezeptorkonfiguration von einem hohen K_M-Wert auf einen niedrigeren reguliert (Lad 40).

Auch für die Aktivität der Adenylatcyclase scheint ein Nucleotid-regulierendes Protein erforderlich zu sein (69).

Seine Anwesenheit ist u.a. Voraussetzung dafür, daß das natürliche Substrat der Adenylatcyclase, das MgATP, verwendet werden kann (Schlegel 69). Außerdem soll es in Gegenwart von Glucagon und GTP einen Komplex bilden, der Rezeptor und katalytische Einheit des Enzyms verbindet. Obwohl es eine Reihe von Untersuchungen über das Guanylnucleotid-regulierende Protein und die Wirkung von GTP gibt (vgl. 79,76,24), herrscht über die Wirkungsweise noch keine endgültige Klarheit.

Eine verstärkte Wirkung dieses modifizierenden Faktors muß beim Diabetes angenommen werden. Während bei stoffwechselgesunden Ratten eine Stimulation der Adenylatcyclase mit Glucagon und GTP die Aktivität des Enzyms 2,2fach gegenüber der alleinigen Stimulation mit Glucagon für alle Zeitpunkte nach Teilhepatektomie erhöht, betrug die Rate bei diabetischen Tieren das 3,Ofache. Damit kann die bei Diabetes und zusätzlicher Teilhepatektomie gegenüber den stoffwechselgesunden Tieren reduzierte Glucagonstimulierbarkeit durch Zugabe von GTP ausgeglichen werden. Die mit Glucagon und GTP stimulierten Aktivitäten unterscheiden sich nämlich nicht bei diabetischen und stoffwechselgesunden Tieren. Zu ähnlichen Ergebnissen über die verstärkte Wirkung des GTP bei diabetischen Tieren ohne Teilhepatektomie kommt auch Allgayer (2).

Leider liegen keine Messungen über den GTP-Gehalt der Leber vor und nach einer Teilhepatektomie vor, so daß nicht entschieden werden kann, ob auch in vivo beim Diabetes eine vermehrte GTP-Konzentration die Glucagon-stimulierte Adenylatcyclaseaktivität auf demselben Aktivitätsniveau halten kann wie bei stoffwechselgesunden Tieren.

Ionen sind ein weiterer wichtiger Faktor, der prinzipiell in das System Hormonplasmakonzentration - Hormonbindung - hormonell stimulierte Enzymaktivität eingreift. Speziell die Mg^{++}-Konzentration (69,32,68,46,61) spielt eine große Rolle, wobei ein Zusammenhang mit dem Guanylnucleotid-bindenden Protein bestehen könnte (vgl. 68). Aber auch die Ca^{++}-Konzentration beeinflußt die Adenylatcyclase, und zwar hemmend (32). Ob, bzw. inwieweit diese in vitro gefundenen Ergebnisse für die in dieser Arbeit beobachteten Zusammenhänge zwischen Hormonplasmakonzentration und Hormonbindung sowie Enzymaktivität von Bedeutung sind, kann aufgrund fehlender Untersuchungen hierzu nicht näher diskutiert werden.

Ein Einfluß auf das System könnte schließlich auch von Faktoren ausgehen, die nach einer Teilhepatektomie die Zellteilung und das Zellwachstum steuern. Speziell käme dafür ein Neuraminsäure enthaltender proliferationsfördernder Faktor in Frage, wie ihn Ruhenstroth-Bauer (83) aus der regenerierenden Leber isolierte. Weiter wären Veränderungen der Membranzusammensetzung, die im Zusammenhang mit der nach Teilhepatektomie vorkommenden Membranfusion stehen, zu diskutieren.

Eine Interpretation der in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse muß berücksichtigen, daß andere Arbeiten keineswegs immer zu vergleichbaren Resultaten kamen. Während es bei der Hormonplasmakonzentration kaum Unterschiede gibt (vgl. Literaturzusammenstellung bei Bachmann 5), unterscheiden sich die Ergebnisse bei der Hormonbindung und der Adenylatcyclaseaktivität doch erheblich.

Als Beispiel seien die Unterschiede bei den diabetischen Kontrolltieren genannt: Soman (74), Hepp (26) und Allgayer (2) fanden, wie auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt, die durch Glucagon stimulierte Adenylatcyclaseaktivität der diabetischen Tiere gegenüber den gesunden erhöht, Chandramouli (12) und Levelliers (45) unverändert und Hughes (32) erniedrigt. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die Ergebnisse Levelliers aus dem Homogenat stammen, und die von Hepp an Mäuseleberpartikeln gemessen wurden. Chandramouli, Soman und Hughes unterscheiden sich von der vorliegenden Arbeit durch eine andere Diabetesdauer und Intensität, durch ein anderes Rattenalter sowie eine andere Plasmamembranpräparationsmethode und einen unterschiedlichen Adenylatcyclasetest. Da die Ergebnisse dieser Arbeiten nicht nur gegenüber der hier vorliegenden, sondern auch untereinander stark differieren, liegt es, wie schon eingangs erwähnt, nahe, die unterschiedlichen Methoden dafür verantwortlich zu machen.

Akzeptiert man die Ergebnisse in der hier vorliegenden Form, so folgt als dritte Erkenntnis dieser Arbeit, daß der Zelle eine regulatorische Fähigkeit innewohnt in dem Sinne, daß sie individuell die für ihre "Bedürfnisse" relativ groben Hormonplasmaänderungen durch Regulationsmechanismen in ihrer Oberflächenmembran modulieren kann.

Ein "Sinn" in dieser Regulationsfähigkeit läge z.B. darin, daß sich die Zelle vor einer Überflutung mit Hormonen schützen muß, wie es etwa beim raschen Anstieg der Glucagonplasmakonzentration nach Teilhepatektomie der Fall ist. Zu demselben Schluß gelangte Bachmann (5) aufgrund ähnlicher Ergebnisse wie in der vorliegenden Arbeit. Allerdings

scheint es nicht nur ein reiner Schutzmechanismus zu sein. Für eine weitergehende Bedeutung spricht, daß die Glucagonbindung auf dem niedrigen Niveau im Zeitraum von 24 Stunden bis zu 5 Tagen nach Teilhepatektomie verharrt, obwohl die Glucagonplasmakonzentration wieder absinkt.

Der Mechanismus, mit dem eine verminderte Glucagonbindung eine Überflutung der Zelle durch das unmittelbar nach Teilhepatektomie stark vermehrt angebotene Glucagon verhindern soll, scheint in ähnlicher Weise auch bei der langdauernden Einwirkung unphysiologischer Hormonkonzentrationen wirksam zu sein. Beim Vergleich gesunder und diabetischer Tiere führt ein Absinken der Insulinplasmakonzentration bei den diabetischen zu einer starken Erhöhung der Insulinbindung. Unter der Annahme, daß die Insulinkonzentration und die Rezeptorkonzentration im Gleichgewicht mit der Konzentration des Rezeptor-Insulin-Komplexes stehen ($[I] + [R] = [RI]$) könnte durch die vermehrte Bindung der Insulinmangel zumindest teilweise ausgeglichen werden. Ungeklärt ist noch, ob dabei eine vermehrte Anzahl von Insulinrezeptoren durch Neusynthese zur Verfügung steht (Freychet 21, Davidson 14), oder aber, ob es sich um eine Demaskierung von schon vorhandenen Rezeptoren handelt (Mourelle 53), in die die früher erwähnten modifizierenden Faktoren (Lipide usw.) eingreifen könnten.

Ein ähnliches Prinzip liegt wohl auch der inversen Korrelation zwischen Hormonplasmakonzentration und hormonell stimulierter Enzymaktivität zu Grunde, nämlich der Schutz des Enzyms vor einer Überflutung mit Hormon. Die im konkreten Beispiel nach Teilhepatektomie zwischen die hohe Glucagonplasmakonzentration und die erniedrigte, durch

Glucagon stimulierte Adenylatcyclaseaktivität eingeschobene Bindung scheint dabei die für diese Situation der Adenylatcyclase benötigte geringe Glucagonkonzentration nicht ausreichend zu vermindern.

Die oben festgestellte Regulationsfähigkeit der Zelle dürfte die vom einzelnen Hormon ausgehende Information auf die Möglichkeiten der Einzelzelle einregulieren. Die Hormone selbst steuern wahrscheinlich im Zusammenspiel mit anderen Hormonen die für den Gesamtorganismus benötigten Vorgänge.

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit gemessenen verminderten Adenylatcyclaseaktivitäten im Zeitraum von 12 bis 24 Stunden nach Teilhepatektomie und - mit Einschränkungen - auch im anschließenden Zeitraum bis zu 5 Tagen wäre ein verminderter cAMP-Spiegel in der Leber zu erwarten. Dem steht gegenüber, daß alle daran interessierten Arbeitsgruppen (vgl. Bachmann (5) oder Übersicht bei Fausto (19)) einen Anstieg der cAMP-Konzentration in der Leber nach Teilhepatektomie fanden. Diesen Widerspruch bemerkten auch andere Autoren, z.B. Fausto, konnten ihn aber noch nicht klären. Es muß angenommen werden, daß noch andere Faktoren, z.B. andere Hormone, gleichzeitig mit Glucagon auf die Adenylatcyclase einwirken und entweder die Glucagonwirkung modifizieren oder aber um die Einwirkstellen auf das Enzym konkurrieren.

In den vorliegenden Versuchsreihen bietet sich als zweites Hormon das Insulin an, das nach Hepp (26) einen hemmenden Einfluß auf die Adenylatcyclase hat. Besonders augenfällig wird das gleichzeitige Einwirken der beiden

Hormone Glucagon und Insulin im Zeitraum von 24 Stunden bis 5 Tage nach Teilhepatektomie, in dem trotz einer niedrigen Glucagonbindung, bei der eigentlich eine niedrige Stimulation der Adenylatcyclase zu erwarten wäre, eine hohe Aktivität festgestellt wurde. Erklären könnte dies eine gleichzeitig bestehende niedrige Insulinkonzentration, d.h. eine verminderte Hemmung. Damit läge ein weiteres Beispiel für das gleichzeitige Mitwirken von Glucagon und Insulin an der Regeneration der Leber nach Teilhepatektomie vor. Dieses gleichzeitige Mitwirken wurde bereits von mehreren Autoren für andere Untersuchungszeiträume und aufgrund anderer Experimente beobachtet (Bucher 11, Literaturübersicht bei Leffert 43).

Zu prüfen bleibt, inwieweit die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse über gewisse Gesetzmäßigkeiten beim System Hormonplasmakonzentration - Hormonbindung - hormonell stimulierte Enzymaktivität sich nur auf die Hormone Insulin und Glucagon beschränken, oder ob auch bei anderen Peptidhormonen sowie auch bei Medikamenten, Endorphinen usw., die für ihre Wirkung eines Rezeptors bedürfen, ähnliche Regulationsmechanismen ablaufen.

Zum Schluß sei noch kurz auf ein weiteres auffälliges Ergebnis dieser Arbeit eingegangen, das nicht unmittelbar mit der Hauptaufgabe dieser Arbeit, das System Hormonplasmakonzentration - Hormonbindung - hormonell stimulierte Enzymaktivität zu untersuchen, in Zusammenhang steht.

Ein bemerkenswerter Befund ist, daß im Zeitraum von 12 bis 24 Stunden nach Teilhepatektomie bei stoffwechselge-

sunden wie bei diabetischen Tieren vergleichbare Niveaus auftreten sowohl hinsichtlich der Hormonplasmakonzentration, der Hormonbindung und der Adenylatcyclase. Dies gilt jeweils für Glucagon wie für Insulin. Dies läßt darauf schließen, daß für die Regeneration offenbar gewisse absolute Werte notwendig sind. Bei den Bindungswerten unterscheiden sich diabetische und gesunde Tiere bis zum 10. Tage nach Teilhepatektomie nicht voneinander. Dies gilt wiederum jeweils für Glucagon wie für Insulin. Auffällig ist, daß die Werte der diabetischen Tiere den bei der Regeneration benötigten Konzentrationen von vornherein ähnlicher sind.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Über das Zusammenwirken der einzelnen Komponenten des Systems Hormonplasmakonzentration - Hormonbindung - hormonell stimulierte Enzymaktivität existiert bis jetzt noch keine lückenlose Übersicht. Erst einige wenige Faktoren sind bekannt. Für Insulin ist durch in vivo- und in vitro-Experimente eine inverse Korrelation zwischen Hormonplasmakonzentration und Hormonbindung bei langdauerndem Einwirken unphysiologisch hoher Insulinkonzentrationen gut fundiert. Ebenfalls gesichert scheint das Einwirken von modifizierenden Faktoren auf die bzw. zwischen den Komponenten des Systems.

Inhalt dieser Arbeit war es, anhand von zwei Versuchsreihen, die mit ausgeprägten endogenen Schwankungen der Hormone Insulin und Glucagon einhergehen, die Zusammenhänge zwischen Hormonplasmakonzentration, Hormonbindung und hormonell stimulierter Enzymaktivität in vivo bei Ratten zu untersuchen. In einer ersten Versuchsreihe wurde eine Hyperglucagonämie durch 2/3-Teilhepatektomie bei stoffwechselgesunden Tieren ausgelöst. In der zweiten Versuchsreihe wurde die 2/3-Teilhepatektomie bei diabetischen Ratten durchgeführt. Dies bot die Möglichkeit, zusätzlich zu den durch die Teilhepatektomie allein hervorgerufenen Hormonänderungen die pathologischen Insulin- und Glucagonplasmakonzentrationen, die die diabetische Stoffwechsellage ausmachen, miteinzubeziehen. In beiden Versuchsreihen wurden neben der Hormonplasmakonzentration die Hormonbindung an die spezifischen Rezeptoren der Leberplasmamembran und die sowohl durch Glucagon als auch durch Insulin beeinflußbare Adenylatcyclase als Enzym, das die Hormonwirkung vermittelt, untersucht.

Die Bestimmung leberspezifischer Enzyme im Blutplasma ermöglichte es, die Vergleichbarkeit der einzelnen Tiere bezüglich einer möglichen Leberzellschädigung untereinander festzustellen. Bei den diabetischen Tieren ergab sich dabei eine leichte, sehr wahrscheinlich Diabetes-bedingte Leberzellschädigung.

Da aus der Literatur der Einfluß unterschiedlicher Plasmamembranpräparationen vor allem auf die Adenylatcyclase bekannt war, wurden routinemäßig Membranmarkerenzyme und Enzyme, die die Verunreinigung mit anderen Zellorganellen anzeigen, bestimmt. Dadurch ließ sich nachweisen, daß bei beiden Versuchsreihen die präparierten Leberplasmamembranen vergleichbar waren und gegenüber der Literatur in ausreichender Reinheit vorlagen.

In der vorliegenden Arbeit fand sich bei stoffwechselgesunden und diabetischen Ratten sowohl für Insulin als auch für Glucagon eine inverse Korrelation zwischen Hormonplasmakonzentration und Hormonbindung. Diese inverse Korrelation traf aufgrund der vorliegenden Ergebnisse auch bei raschen, ausgeprägten Hormonplasmaänderungen zu, wie sie z.B. unmittelbar nach Teilhepatektomie für Glucagon auftraten. Invers korreliert scheinen unter den genannten zwei Bedingungen auch die Hormonplasmakonzentration und die Enzymaktivität der Adenylatcyclase zu sein.

Dieses Verhalten der Komponenten zueinander führt zur Annahme, daß es Einflüsse gibt, die hemmend beziehungsweise stimulierend auf diese Komponenten einwirken oder zwischen diesen wirken. Aufgrund der Zusammenschau der

eigenen Untersuchungen mit den in der Literatur durch überwiegend in in vitro-Experimenten gefundenen modifizierenden Faktoren kommen dafür als erstes Phospholipide, und zwar vor allem Lysophosphatidylcholin, in Frage. Daneben spricht vieles für ein Mitwirken eines Guanylnucleotid-sensiblen Nucleotid-regulierenden Proteins, das nach den vorliegenden Ergebnissen beim Diabetes verstärkt wirksam sein könnte. Auf andere, in vitro gefundene Faktoren, die das System beeinflussen, wie z.B. bestimmte Ionen, konnte infolge fehlender Untersuchungen nicht weiter eingegangen werden.

Als Folgerung aus den gewonnenen Ergebnissen muß angenommen werden, daß die Einzelzelle eine regulatorische Fähigkeit besitzt, die die groben, auf den Gesamtorganismus abgestellten Hormonplasmaänderungen auf die Bedürfnisse und Fähigkeiten der einzelnen Zelle hin abändert. Daneben darf mit großer Wahrscheinlichkeit auch ein kombiniertes Einwirken von Insulin und Glucagon auf die Aktivität der Adenylatcyclase, wie es mehrfach in der Literatur beschrieben wurde, angenommen werden.

Als Nebenbefund ergab sich schließlich aus dieser Arbeit, daß gewisse minimale absolute Niveaus bei der Hormonplasmakonzentration, der Hormonbindung und auch bei der Enzymaktivität der Adenylatcyclase für die Leberregeneration vorhanden sein müssen. Denn die absoluten Werte dieser Faktoren der diabetischen und der stoffwechselgesunden Tiere unterscheiden sich nach Teilhepatektomie nicht voneinander und dies trotz zum Teil sehr unterschiedlicher Ausgangssituationen bei den Kontrolltieren ohne Teilhepatektomie. Dies gilt sowohl für Glucagon als auch für Insulin.

LITERATURVERZEICHNIS

1. AISCHYLOS

Prometheus desmotes
in: Aischyli Tragoedia, Scriptorum classicorum Bibliotheca Oxoniensis (= Oxford-Ausgabe)
von: Denys Page, Oxford 1972[1].

2. ALLGAYER, H.

Die Bedeutung von Glucagon und Insulin auf die Pathogenese des Diabetes und die Regulation des Adenylatcyclasesystems;
Dissertationsschrift (1978)

3. ALTMANN, H.-W., BÜCHNER, F., COTTIER, H., GRUNDMANN, E., HOLLE, G., LETTERER, E., MASSHOFF, W., MEESSEN, H., ROULET, F., SEIFERT, G., SIEBERT, G., STUDER, A., Eds.

Die reparative Parenchymregeneration am Beispiel der Leber nach Teilhepatektomie;
Handbuch der allgemeinen Pathologie S. 129-243,
Springer-Verlag,Berlin-Heidelberg-New York (1972)

4. ARCHER, J.A., GORDEN, P., GAVIN, J.R., LESNIAK, M.A., ROTH, J.

Insulin receptors in human circulating lymphocytes: Application to the study of insulin resistance in man;
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36, 627-633 (1973)

5. BACHMANN, W.,

Zur Wechselwirkung von Leberschäden und diabetischer Stoffwechselstörung;
Habilitationsschrift (1979

6. BACHMANN, W., HARMS, E., HASSELS, B., HENNINGER, H.P., REUTTER, W.

Studies on Rat Liver Plasma Membrane
Altered Protein and Phospholipid Metabolism after Injection of D-Galactosamine
Biochem. J. 166, 455-462 (1977)

7. BACHMANN, W., REUTTER, W.

Plasma Membrane of the Regenerating Rat Liver, Plasma Membrane as a Key Target Organelle in Galactose-Induced Hepatitis;
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 81-87 (1979)

8. BACHMANN, W., BÖTTGER, I., ALLGAYER, H., HASLBECK, M., HEPP, K.D.

Insulin-, Glucagonbindung und Adenylatcyclase-Aktivität von Leberplasmamembranen Streptozotocin-diabetischer Ratten;
Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin 84, 1217-1220
J. F. Bergmann Verlag, München (1978)

9. BIRNBAUMER, L.

The hormone-sensitive adenyl cyclases. Useful models for studying hormone receptor functions in cell-free systems;
Biochim. Biophys. Acta 436, 495-504 (1976)

10. BRESNICK, E.

Regenerating Liver: An Experimental Model for the Study of Growth;
Methods in Cancer Research, Vol. VI, 347-397 (1971)

11. BUCHER, N.L.R., SWAFFIELD, M.N.

Regulation of hepatic regeneration in rats by synergistic action of insulin and glucagon;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1157-1160 (1975)

12. CHANDRAMOULI, V., CARTER, J.R.

Cell Membrane Changes in Chronically Diabetic Rats;
Diabetes 24, 257-263 (1975)

13. CHANDRAMOULI, V., WILLIAMS, H., MARSHALL, W.

Cell surface Changes in Diabetic Rats: Studies of Lectin Binding to Liver Cell Plasma Membrane;
Biochim. Biophys. Acta 465, 19-25 (1977)

14. DAVIDSON, M.B., KAPLAN, S.A.

Increased Insulin Binding by Hepatic Plasma Membrane from Diabetic Rats;
J. Clin. Invest. 59, 22-31 (1977)

15. DELAHUNTY, T.J., RUBINSTEIN, D.

Accumulation and release of triglycerides by rat liver following partial hepatectomy;
J. Lip. Res. 11, 536-543 (1970)

16. DIPPLE,I., HOUSLAY, M.D.

The Activity of Glucagon-Stimulated Adenylate Cyclase from Rat Liver Plasma Membranes is Modulated by the Fluidity of its Lipid Environment; Biochem. J. 174, 179-190 (1978)

17. DE DUVE, C., PRESSMANN, B.C., GANETTO, R., WATTIAUX, R., APPLEMANS, O.O.

Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue;
Biochem. J. 60, 604-617 (1955)

18. EMMELOT, P., BOS, C.J.

Studies on plasma membranes of rat liver;
Biochim. Biophys. Acta 120, 369-382 (1962)

19. FAUSTO, N., BUTCHER, F.R.

Cyclic Nucleotide Levels in Regenerating Liver;
Biochim. Biophys. Acta 428, 702-706 (1976)

20. FEX, G.

Metabolism of Phosphatidyl Choline, Phosphatidyl Ethanolamine and Sphingomyelin in Regenerating Rat Liver;
Biochim. Biophy. Acta 231, 161-169 (1971)

21. FREYCHET, P.

Interaction of Polypeptide Hormones with Cell Membrane Specific Receptors: Studies with Insulin and Glucagon;
Diabetologia 12, 83-100 (1976)

22. GAVIN, J.R., ROTH, J., NEVILLE, Jr.,D.M., DE MEYTS, P., BUELL, D.N.

Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations: A direct demonstration in cell culture;
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 84-88 (1974)

23. HALES, C.N., RANDLE, P.J.

Immunoassay of Insulin with Insulin-Antibody Precipitate;
Biochem. J. 88, 137-145 (1963)

24. HAMMES, H., RODBELL, M.

Simple Model for Hormon-Activated Adenylate Cyclase Systems;
Proc. Nat. Acad. Sci USA 73, 1189-1192 (1976)

25. HELMREICH, E.J.M., ZENNER H.P., PFEUFFER, T.

Signal Transfer from Hormone Receptor to Adenylate Cyclase;
Curr. Topics in Cell Regul. 10, 41-87 (1976)

26. HEPP, K.D.

Adenylate Cyclase and Insulin Action;
Eur. J. Biochem. 31, 266-276 (1972)

27. HIGGINS, G.M., ANDERSON, R.M.

Experimental pathology of the liver: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal;
Arch. Pathol. 12, 186-202 (1931)

28. HOUSE, P.D.R., POULIS, P., WEIDEMANN, M.J.

Isolation of a Plasma-Membrane Subfraction from Rat Liver Containing an Insulin-Sensitive Cyclic-AMP Phosphodiesterase;
Eur. J. Biochem. 24, 429-437 (1972)

29. HOUSLAY, M.D., HESKETH, T.R., SMITH, G.A. WARREN,G.B., METCALFE, J.C.

The Lipid Environment of the Glucagon Receptor Regulates Adenylate Cyclase Activity;.
Biochim. Biophys. Acta 436, 495-504 (1976)

30. HOUSLAY, M.D., PALMER, R.W.

Lysophosphatidylcholines Can Modulate the Activity of the Glucagon-Stimulated Adenylate Cyclase from Rat Liver Plasma Membranes;
Biochem. J. 178, 217-221 (1979)

31. HOUSLAY, M.D., DIPPLE, I., ELLIOTT, D.

GTP and p(NH) ppG Effect a Collision Coupling Mechanism Between the Glucagon Receptor and Catalytic Unit of Adenylate Cyclase;
Biochem. J. 186, 649-658 (1980)

32. HUGHES, A., COORE, K.

Effect of Glucagon on Calcium Binding by Rat Liver Plasma Membrane;
Int. J. Biochem. 9, 751-758 (1978)

33. ILLIANO, G., CUATRECASAS, P.

Modulation of Adenylate Cyclase Activity in Liver and Fat Cell Membranes by Insulin;
Science 175, 906-908 (1971)

34. KAHN, C.R., NEVILLE, Jr., D.M., ROTH, J.

Insulin-receptor interaction in the obese-hyperglycemic mouse. A model of insulin resistance;
J. Biol. Chem. 248, 244-250 (1973)

35. KEMMLER, W., RENNER, R., ZYNAMON, A., HEPP, K.D.

Interaction between insulins and liver membrane receptors of guinea pig, beef and chicken;
Biochim. Biophys. Acta 543, 349-356 (1978)

36. KIMURA, N., NAGATA, N.

The Requirement of Guanine Nucleotides for Glucagon Stimulation of Adenylate Cyclase in Rat Liver Plasma Membranes;
J. Biol. Chem. 252, 3829-3835 (1977)

37. KIMURA, N., NAGATA, N.

Mechanism of Glucagon Stimulation of Adenylate Cyclase in the Presence of GDP in Rat Liver Plasma Membranes;
J. Biol. Chem. 254, 3451-3457 (1979)

38. KISS, Z.

persönliche Mitteilung

39. KOIZUMI, K., ITO, Y., KOJIMA, K., FUJII, T.

Isolation and Characterization of the Plasma Membranes from Rat Ascites Hepatomas and from Normal Rat Livers, Including Newborn, Regenerating, and Adult Livers;
J. Biochem. 79, 739-748 (1976)

40. LAD, P.M., WELTON, A.F., RODBELL, M.

Evidence for Distinct Guanine Nucleotide Sites in the Regulation of the Glucagon Receptor and of Adenylate Cyclase Activity:, J. Biol. Chem. 252, 5942-5946 (1977)

41. LAVINE, R.L., VOYLES, N., RECANT, L., PERRINO, P.V.

The Effect of Fasting on Tissue Cyclic-AMP and Plasma Glucagon in the Obese Hyperglycemic Mouse;, Endocrinology 97, 615-620 (1975)

42. LEFFERT, H., ALEXANDER, N.M., FALOONA, G., RUBALCAVA, B., UNGER, R.

Specific endocrine and hormonal receptor changes associated with liver regeneration in adult rats; Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 4033-4036 (1975)

43. LEFFERT, H., KOCH, K.S., MORAN, T., RUBALCAVA, B.

Hormonal Control of Rat Liver Regeneration; Gastroenterology 76, 1470-1482 (1979)

44. LEVEY, G.S., FLETSCHER, M.A. KLEIN, I.

Glucagon and Adenylate Cyclase: Binding Studies and Requirements for Activation; Advances in Cyclic Nucleotide Research 5, 53-65 (1975)

45. LEVILLIERS, J., PAIRAULT, J., LECOT, F., TOURNEMOLLE,A. LAUDAT, M.-H.

Adenosine 3':5'-Monophosphate and Guanosine 3':5'-Monophosphate: Levels and Cyclase Activities in Liver and Adipose Tissue from Diabetic Mice (db/db); Eur. J. Biochem. 88, 323-330 (1978)

46. LIN, M.C., SALOMON, Y., RENDELL, M., RODBELL, M.

The Hepatic Adenylate Cyclase System. II. Substrate Binding and Utilization and the Effects of Magnesium Ion and PH; J. Biol. Chem. 250, 4246-4252 (1975)

47. LONDOS, C., PRESTON, M.S.

Activation of the Hepatic Adenylate Cyclase System by Divalent Cations;
J. Biol. Chem. 252, 5957-5961 (1977)

48. LOUIS, S.L., BRIVIO-HAUGLAND, R.P., WILLIAMS, M.A.

Effect of Essential Fatty Acid Deficiency on Activity of Liver Plasma Membrane Enzymes in the Rat;
J. Supramol. Struct. 4, 487-496 (1976)

49. LOWRY, O.H., ROSEGROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.

Determination of Protein with the Folin-Reagent;
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

50. MENYHART, J., HORVATH, A., ROSTA, A.

A Reliable Index of Tissue Metabolic Activity during the Initial Phase of Rat Liver Regeneration
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 6, 139-144 (1971)

51. MITSCHELL, R.H., HAWTHORNE, J.N.

The Site of Diphosphoinositide Synthesis in Rat Liver;
Biochem. Biophys. Res. Comm. 21, 333-338 (1965)

52. MORLEY, C.G., KUKU, S., RUBENSTEIN, A.H., BOYER, J.L.

Serum Hormon Levels Following Partial Hepatectomie in the Rat;
Biochem. Biophys. Res. Comm. 67, 653-661 (1975)

53. MOURELLE, M., RUBALCAVA, B.

Changes in the Insulin and Glucagon Receptors in the Regenerating Liver Following Intoxication with Carbon Tetrachloride;
Biochem. Biophys. Res. Comm. 88, 189-198 (1979)

54. NEVILLE, D.M.

The Preparation of Liver Cell Membranes;
J. Biophys. Biochem. Cyt. 8, 413-422 (1968)

55. "Optimierte Standard-Methode"
der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie;
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 8, 658 (1970);
10, 182 (1972)

56. PEKARTHY, J.M., SHORT, J., LANSING, A.I., LIEBERMAN, I.

Function and Controll of Liver Alkaline Phosphatase;
J. Biol. Chem. 247, 1767-1774 (1972)

57. PENNINGTON, F.

Biochemistry of Dystrophic Muscle Mitochondrial Succinate Tetrazolium-Reductase and Adenosine-Triphosphate;
Biochem. J. 80, 649-654 (1961)

58. PILKIS, S.J., EXTON, J.H., JOHNSON, R.A., PARK? C.R.

Effects of Glucagon on Cyclic AMP and Carbohydrate Metabolism in Liver from Diabetic Rats;
Biochim. Biophys. Acta 343, 250-267 (1974)

59. PLIEGO, J.A., RUBALCAVA, B.

The Effect of Temperature on the Activity of the Adeylate Cyclase System of Liver Plasma Membranes;
Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 609-615 (1978)

60. RAY, T.K.

A Modified Method for the Isolation of the Plasma Membrane from Rat Liver;
Biochem. Biophys. Acta 196, 1-9 (1970)

61. RENDELL, M., SALOMON, Y., LIN, M.C., RODBELL, M., BERMAN, M.

The Hepatic Adenylate Cyclase System. III. A Mathematical Model for the Steady State Kinetics of Catalysis and Nucleotide Regulation;
J. Biol. Chem. 250, 4253-4260 (1975)

62. RETHY,A., TOMASI, V., TREVISANI, A., BARNABET, O.

The Role of Phosphatidylserin in the Hormonal Control of Adenylate Cyclase of Rat Liver Plasma Membranes;
Biochim. Biophys. Acta 290, 58-69 (1972)

63. RODBELL, M., KRANS, H.M.J., POHL, S.L., BIRNBAUMER, L.

The Glucagon-sensitive Adenyl Cyclase System in Plasma Membranes of Rat Liver. IV. Effects of Guanyl Nucleotides on Binding of ^{125}I-Glucagon; J. Biol. Chem. 246, 1872-1876 (1971)

64. RODBELL, M., BIRNBAUMER, L., POHL, S.L., KRANS, H.M.J.

The Glucagon-sensitive Adenyl Cyclase System in Plasma Membranes of Rat Liver. V. An Obligatory Role of Guanyl Nucleotides in Glucagon Action; J. Biol. Chem. 246, 1877-1882 (1971)

65. RODBELL, M., KRANS, H.M.J., POHL, S.L., BIRNBAUMER, L.

The Glucagon-sensitive Adenyl Cyclase System in Plasma Membranes of Rat Liver. III. Binding of Glucagon: Method of Assay and Specificity; J. Biol. Chem. 246, 1861-1871 (1971)

66. RODBELL, M., LIN, M.C., SALOMON, Y.

Evidence for Interdependent Action of Glucagon and Nucleotides on the Hepatic Adenylate Cyclase System; J. Biol. Chem. 249, 59-65 (1974)

67. SAKURAI, I., DOBBS, H., UNGER, R.H.

The Role of Glucagon in the Pathogenesis of the Endogenous Hyperglycemia of Diabetes Mellitus; Metabolism 24, 1295-1299 (1975)

68. SALOMON, Y., LIN, M.C., LONDOS, C., RENDELL, M., RODBELL, M.

The Hepatic Adenylate Cyclase System. I. Evidence for Transition States and Structural Requirements for Guanina Nucleotide Activiation; J. Biol. Chem. 250, 4239-4245 (1975)

69. SCHLEGEL, W., KEMPNER, E.S., RODBELL, M.

Activation of Adenylate Cyclase in Hepatic Membranes Involves Interactions of the Catalytic Unit with Multimeric Complexes of regulatory Proteins; J. Biol. Chem. 254, 5168-5176 (1979)

70. SCHMIDT, F.H.

Klin. Wschr. 39, 1244 (1961)

71. STÖCKER, E., HEINE, W.-D.

Regeneration of Liver Parenchyma under Normal and Pathological Conditions;
Beitr. Path. 144, 400-408 (1971)

72. SHORT, J., BROWN, R.F., HUSAKOVA, A., GILBERTSON, J.R., ZEMEL, R., LIEBERMAN, I.

Induction of Deoxyribonucleic Acid Synthesis in the Liver of the Intact Animal;
J. Biol. Chem. 247, 1757-1766 (1972)

73. SOLL, A.H., KAHN, C.R.

Insulin binding to liver plasma membranes in the obese hyperglycemic (ob/ob) mouse. Demonstration of a decreased number of functionally normal receptors;
J. Biol. Chem. 250, 4702-4707 (1975)

74. SOMAN, V., FELIG, P.

Glucagon Binding and Adenylate Cyclase Aktivity in Liver Membranes from Untreatet and Insulin-treated Diabetic Rats;
J. Clin. Invest. 61, 552-560 (1978)

75. STOFFEL, W., DÄRR, W., ASSMANN, G.

Pleomorphe Funktionen von hochungesättigten Phospholipiden in biologischen Membranen und Serumlipoproteinen;
Med. Welt 29, 124-131 (1978)

76. SWISLOCKI, N.I., TIERNEY, J., ESSNER, E.S.

Isolation and Characterization of a Liver Plasma Membrane Fraction Enriched in Glucagon-Sensitive Adenylate Cyclase;
Archives Biochem. Biophys. 174, 291-297 (1976)

77. TAUBER, R., REUTTER, W.

Protein Degradation in the Plasma Membrane of Regenerating Liver and Morris Hepatomas;
Eur. J. Biochem. 83, 37-45 (1978)

78. UNGER, R.H., AGUILLAR-PARADA, E., MÜLLER, W.A., EISENTRAUT, A.M.

Studies of Pancreatic Alpha Cell Function in Normal and Diabetic Sujects;
J. Clin. Invest. 49, 837 (1975)

79. WELTON, A.F., LAD, P.M., NEWBY, A.C., YAMAMURA, H., NICOSIA, S., RODBELL, M.

Solubitazion and Separation of the Glucagon Receptor and Adenylate Cyclase in Guanine Nucleotide-Sensitive States;
J. Biol. Chem. 252, 5947-5950 (1977)

80. WHITE, F., ZENSER, T.V.

Separation of CAMP from Other Nucleotides on Aluminium Oxide Columns: Application to the Assay of Adenylate Cyclase and Guanylate Cyclase;
Anal. Biochem. 41, 372-379 (1971)

81. WRIGHT, G.H.

Changes in Plasma Membrane Enzyme Activities During Liver Regeneration in the Rat;
Biochim. Biophys. Acta 470, 368-381 (1977)

82. ZOLLINGER, H.U., ROHR, H.P., STREBEL, J., BIANCHI,L.

Ultrastrukturell-morphometrische Untersuchungen an der Rattenleberparenchymzelle in der Frühphase der Regeneration nach partieller Teilhepatektomie;
Beitr. Path. 141, 52-74 (1970)

83. RUHENSTROTH-BAUER, G., GOLDBERG, M., SILZ, S., STRECKER, W.

Anreicherung und Charakterisierung eines Leberzell-Proliferationsfaktors aus teilhepatektomierten Rattenlebern;
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 543-545 (1978)

84. SUTHERLAND, F.W., ROBINSON, G.A., BUTCHER, R.W.

Some Aspects of the Biological Role of Adenosine 3':5' Monophosphate (Cyclic AMP);
Circulation 37, 279 - 306 (1968)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. W. Bachmann für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit, die ich unter seiner Leitung im Institut für Diabetesforschung ausgeführt habe. Durch Diskussion und Kritik beim Auswerten und Niederschreiben der Ergebnisse hat er mir wertvolle Hilfe geleistet.

Herrn Dr. med. I. Böttger danke ich für die radioimmunologische Bestimmung von Plasmainsulin und -glucagon, Herrn Prof. Dr. med. K. D. Hepp für die Erlaubnis, sein Rechenprogramm zum Auswerten des Adenylatcyclasetests zu verwenden, und Herrn Dr. med. Janka für die Überlassung des Prostacyclins.

Außerdem bin ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Diabetesforschung, insbesondere Frl. Krug, für ihre vielfältige Hilfe sehr zu Dank verpflichtet.

L E B E N S L A U F

Christoph K N O T H E

geboren	23. Mai 1955 in München
Eltern	Dipl.-Ing. Heinrich Knothe Abteilungsdirektor Luise Knothe, geb. Knecht
Schulen	1962 - 1966 Volksschule an der Torquato-Tasso-Straße in München 1966 - 1975 Humanistisches Maximilians-Gymnasium in München Abitur 1975
Universität	1975 - 1981 Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
Staatsexamen	1978 I. Teil 1980 II. Teil 1981 III. Teil
Promotion	Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. med. W. Bachmann am Institut für Diabetesforschung angefertigt.